# Untersuchungen über Reparaturmechanismen in UV-Geschädigten H. EP. 2-Zellen und Maus L-Zellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

1975

vorgelegt von

Brigitta Lehmann
aus Berlin

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533913_0034

# Untersuchungen über Reparaturmechanismen in UV-Geschädigten H. EP. 2-Zellen und Maus L-Zellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Brigitta Lehmann
aus Berlin

1974

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Professor Dr.rer.nat. Dieter Hartmann ausgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent : Prof. Dr.rer.nat Dieter Hartmann
2. Referent : Prof. Dr.med. Bernhard Schmidt
3. Referent : Prof. Dr.rer.nat. Hans Rainer Maurer

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 1975

INHALTSÜBERSICHT


Seite

Abkürzungen 5

A. EINLEITUNG

1. Entstehung von Pyrimidin-Dimeren und ihre Struktur 6
2. Photochemisches Verhalten der Purine 7
3. Vorkommen und Eliminierung dimerer Pyrimidine in biologischen Systemen 8
   3.1. Photoreaktivierung 8
   3.2. Dunkelreaktivierung 1o
4. UV-Schäden und Reparaturprozesse in Säugetierzellen 13
   4.1. Photoreaktivierung und Excisions-reparatur 13
   4.2. Reparatur-Replikation und außerplanmäßige DNS-Synthese 14
   4.3. UV-Bestrahlung von Säugetieren in vivo 18
   4.4. UV-Bestrahlung von Maus L-Zellen 18
   4.5. UV-Bestrahlung von H.Ep.2-Zellen 2o
5. Wirkung von Inhibitoren auf UV-bestrahlte Säugetierzellen 21
   5.1. Wirkung von Coffein auf UV-bestrahlte Säugetierzellen 21
   5.2. Wirkung von Oxyharnstoff auf UV-bestrahlte Säugetierzellen 25

B. ZIEL DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN 27

Seite

C. MATERIAL UND METHODIK


1. Ursprung und Haltung der Gewebekultur 28
   1.1. Herstellung des Kulturmediums und Züchtung der Zellen 28
   1.2. Herstellung der Trypsin-AeDTA-Lösung 29
2. Sterilitätskontrollen 3o
3. Bestrahlung mit UV-Licht 3o
   3.1. UV-Dosimetrie 3o
   3.2. Bestrahlung der Zellen 31
4. Anwendung von Chemikalien 31
   4.1. Inhibitoren 31
   4.2. Enzyme und andere Chemikalien 31
5. Radioaktive Markierung der Zellen 32
6. Radioaktivitätsmessung 32
   6.1. Aufarbeitung der Zellen 32
   6.2. Meßgeräte 32
7. Synchronisation der Zellen 33


D. ERGEBNISSE


1. Untersuchung der Aufnahme von Coffein 34
   1.1. Radioaktivitätsverteilung des Coffeins 34
   1.2. Abhängigkeit der Coffein-Aufnahme von der Inkubationszeit 35
   1.3. Coffein-Aufnahme in Abhängigkeit von der UV-Dosis 38
   1.4. Coffein-Aufnahme in Abhängigkeit von der Coffein-Konzentration 39
   1.5. Versuche zur Penetrationserhöhung von Coffein 41

Seite

2. Versuche zur Abgabe von $^{3}$H-TDR nach UV-Bestrahlung 42
3. Versuche zur Aufnahme von $^{3}$H-TDR nach UV-Bestrahlung 45
   3.1. Abhängigkeit der $^{3}$H-TDR-Aufnahme von der Inkubationszeit nach der nach der UV-Bestrahlung 45
   3.2. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung 46
4. Einwirkung von Coffein auf die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen 51
5. Einwirkung von Oxyharnstoff auf die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen 58
6. Statistische Prüfung der Ergebnisse 66

E. DISKUSSION

1. Aufnahme von Coffein-$^{14}$C nach UV-Bestrahlung 69
2. DNS-Abbau nach UV-Bestrahlung 71
3. Reparaturprozesse nach UV-Bestrahlung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen 73
4. Einfluß von Coffein auf die Reparatur-Replikation 76
5. Einfluß von Oxyharnstoff auf die Reparatur-Replikation 78

F. ZUSAMMENFASSUNG 81

G. LITERATURVERZEICHNIS 83

Abkürzungen

TT = Thymin -Dimer
UU = Uracil - Dimer
UT = Uracil - Thymin - Mischdimer
TCE = Trichloressigsäure
PBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
AeDTA = Äthylendiamintetraessigsäure
TDR = Thymidin
$^{3}$H-TDR = Tritium - markiertes Thymidin
HU = Oxyharnstoff (Hydroxyurea)
mM = millimolar
XP = Xeroderma pigmentosum
LH = Liquid Holding
Coffein* = Gemisch aus radioaktivem und inaktivem Coffein mit einer Gesamtkonzentration von 2 mM
MEM = minimum essential medium

# A. EINLEITUNG

## 1. Entstehung von Pyrimidin-Dimeren und ihre Struktur

Im Jahre 1958 gelang es Beukers, Ilstra und Berends (5), durch UV-Bestrahlung einer gefrorenen Thyminlösung und Isolierung der entstandenen Substanz dimeres Thymin (TT) darzustellen. Zwei Jahre später konnten sie die Struktur des Bestrahlungsproduktes aufklären (6).

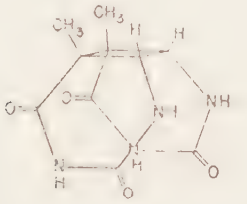



Abb. 1 : Dimeres Thymin

Bei weiteren Versuchen konnten nach UV-Bestrahlung gefrorener Lösungsgemische sowohl dimeres Uracil (UU) als auch gemischte Dimere von Thymin und Uracil (UT) nachgewiesen werden (8o,91,92). 1971 gelang Varghese die Darstellung von Cytosin-Dimeren durch UV-Bestrahlung einer gefrorenen Cytosinribosid-Lösung (88).

Wulff und Fraenkel postulierten 1961 (98), daß dimeres Thymin in vier stereoisomeren Formen auftreten kann:

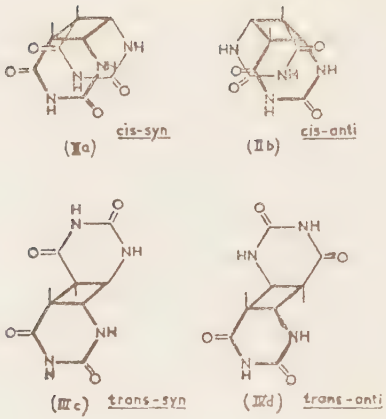



Abb. 2: Vier stereoisomere Dimere des Thymins
(nach Wulff und Fraenkel (98) )

Das bei der Säurehydrolyse von UV-bestrahlter DNS isolierte TT weist jedoch immer die Form I auf, die unter Berücksichtigung ihrer Entstehung aus zwei benachbarten Thymin-Molekülen eines DNS-Stranges auch zu erwarten ist (95).

## 2. Photochemisches Verhalten der Purine

Bei einer Untersuchung der in der DNS vorkommenden Purine stellte sich heraus, daß diese unter Einwirkung von UV-licht keine Dimeren bilden. Zur photochemischen Veränderung des Purinmoleküls sind wesentlich höhere Strahlendosen erforderlich als bei den Pyrimidinen (82). Die Photochemie der Purine ist also biologisch unbedeutend, da vor Bildung von Purinphotoprodukten bereits eine Inaktivierung der

biologischen Systeme durch Pyrimidin-Schäden stattgefunden hat.

## 3. Vorkommen und Eliminierung dimerer Pyrimidine in biologischen Systemen

Nach der Hydrolyse UV-bestrahlter Bakterien, deren DNS mit Thymin-2-$^{14}$C markiert war, fanden Wacker, Dellweg und Weinblum (9o) eine Verbindung, die sie 1961 als dimeres Thymin identifizierten (91). Es stellte sich heraus, daß TT die hauptsächliche Ursache der letalen Wirkung der UV-Strahlung ist (77). In der folgenden Zeit konnten auch in Bakteriophagen und vielen anderen DNS- und RNS-haltigen biologischen Systemen (7,72,73,86,99)nach UV-Bestrahlung Pyrimidin-Dimere nachgewiesen werden.

1966 teilten Klimek und Vlasinova (45) mit, daß die Fähigkeit von Maus L-Zellen zur DNS-Synthese unmittelbar nach der UV-Bestrahlung verringert ist und innerhalb von 48 Stunden wieder auf den Normalwert ansteigt. Die Strahlenempfindlichkeit der Zellen steht also in direkter Relation zu ihrer Reparaturfähigkeit von Strahlenschäden. Die beiden wichtigsten Reparaturmechanismen sind die Photoreaktivierung und die Dunkelreaktivierung.

### 3.1. Photoreaktivierung

Unter der Photoreaktivierung (PHR) versteht man die Wiederherstellung eines biologischen Systems nach seiner Schädigung durch UV-Strahlung unter Verwendung anderer nicht-ionisierender Strahlung (36).

Davon abzugrenzen ist der Photoschutzeffekt (photoprotection effect), unter dem man die Abnahme der UV-Empfindlichkeit

eines biologischen Systems durch vorherige Bestrahlung mit Licht versteht (41).

Schon 1904 gab es die ersten Hinweise auf das Phänomen der PHR (27), aber erst 1949 wurden von Kelner (43) bei Versuchen mit Konidien von Streptomyces griseus und von Dulbecco (27) bei der UV-Bestrahlung von Bakteriophagen ihre Bedeutung erkannt. Inzwischen konnte man an zahlreichen biologischen Objekten (Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen) zeigen, daß die Wirkung der UV-Strahlung ($\lambda$=300 nm) bei anschließender Bestrahlung mit "Licht" ( $\lambda$ = 320-480 nm) bis zu ca. 90% wieder aufgehoben werden kann (73).

Die Photoreaktivierung läßt sich in zwei Reaktionstypen unterteilen:

3.1.1. Direkte photoenzymatische Reparatur des UV-Schadens
Rupert 1960, 1961, 1962 (69-71)
Dieser Mechanismus tritt hauptsächlich bei Bakterien und Bakteriophagen auf.

3.1.2. Indirekte Photoreaktivierung
Jagger und Stafford 1965 (41), Setlow 1966 (74)

### 3.1.1. Direkte photoenzymatische Reparatur

Für diese Art der Reparatur ist ein Enzym, das Photoreaktivierungsenzym, verantwortlich. Es vermag unter Lichteinwirkung die transformierende Aktivität von Bakterien-DNS und die Infektiosität von Virus-DNS wiederherzustellen, die zuvor durch UV-Einwirkung inaktiviert worden waren. Im Dunkeln verbindet es sich mit den UV-geschädigten Regionen der DNS zu einem Komplex, der nach ausreichender Bestrahlung wieder gespalten wird (73,81):

$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{h\nu} E + P$$

E = photoreaktivierendes Enzym
S = Substrat = UV-Photoprodukte in der DNS
ES = Enzym-Substrat-Komplex
P = reparierte DNS
Die Reaktionskinetik wurde 1962 von Rupert (71) untersucht.

### 3.1.2. Indirekte Photoreaktivierung

Jagger und Stafford (41) teilten 1965 mit, daß der Stamm Escherichia coli B $phr^-$, der kein photoreaktivierendes Enzym besitzt, in der Lage ist, unter geeigneten Bedingungen durch die Einwirkung von langwelligem Licht die letalen UV-Schäden zu verringern.

## 3.2. Dunkelreaktivierung

Die Dunkelreaktivierung oder Dunkelreparatur unterscheidet sich von der Photoreaktivierung in folgenden Punkten (36):

a. Sie verläuft ohne Mitwirkung von Licht.
b. Sie erstreckt sich nicht nur auf die Eliminierung von dimeren Pyrimidinen und UV-Schäden, sondern auch auf Schäden anderer Art, z.B. die durch ionisierende Strahlen induzierten Läsionen sowie auf Vernetzungsschäden, die durch alkylierende Substanzen hervorgerufen werden.
c. Dimere Verbindungen und Vernetzungen werden nicht einfach gespalten, sondern in einem komplexen, enzymatischen Prozeß herausgeschnitten und durch neu synthetisierte Abschnitte ersetzt. Es handelt sich demnach um einen universellen Korrekturprozeß, den man häufig auch als Excisionsreparatur bezeichnet.

Ein direkter Nachweis der DNS-Reparatur wurde 1964 von Pettijohn und Hanawalt (58) erbracht. Sie zeigten mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung des schweren Thymin-Antagonisten 5-Bromuracil, daß bei der Dunkelreparatur in Bakterien nur einzelne Abschnitte des DNS-Doppelstranges neu synthetisiert werden, in die das radioaktiv und gewichtsmäßig markierte 5-Bromuracil eingebaut wird. Im Anschluß an eine vorangegangene Photoreaktivierung wird kein Bromuracil in die DNS eingebaut.

Howard-Flanders und Boyce (39) und Howard-Flanders (4o) fixierten 1966 bzw. 1968 die wichtigsten Schritte, die an der DNS-Reparatur von Bakterien beteiligt sind:

1. Einzelstränge der doppelsträngigen DNS werden unterbrochen durch:
   a.strahlungsinduzierte Kettenbrüche,
   b.enzymatischen Herausschnitt geschädigter Basen,
   c.ein Rekombinationsenzym, das in der frühen Phase der genetischen Kombination in Aktion tritt.
2. Durch Enzymwirkung (Endonuclease) werden von den Bruchstellen her Nucleotide freigesetzt. In normalen Zellen sind diese Enzyme anscheinend nur auf bestimmten Abschnitten wirksam.
3. Erweiterung der entstandenen Lücke durch eine 5'-3'-Exonuclease, was sich in einem weiteren Abbau der DNS zeigt.
4. Die DNS-Helixstruktur wird durch eine DNS-Reparatur-Polymerase rekonstruiert, indem komplementäre Nucleotide von einem Ende des Einzelstranges her in die Lücken in 3'-5'-Richtung eingefügt werden. Das Ende des Einzelstranges dient dabei als Initiator, während der intakte DNS-Strang als Matritze dient.
5. Die Reparatur wird durch die Herstellung einer Phosphorsäurediesterbindung mit Hilfe einer Polynucleotid-Ligase

vervollständigt, wenn das letzte Nucleotid in die Lücke eingefügt worden ist.

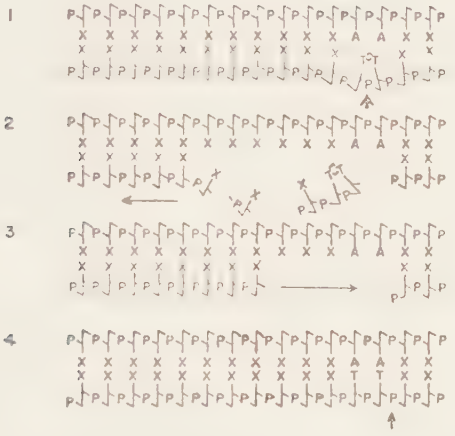


Abb. 3: Schematische Darstellung der Eliminierung von dimerem Thymin aus hochpolymerer DNS nach Howard-Flanders und Boyce (39)

1. DNS-Doppelstrang, der Thymin-Dimer enthält.
2. Das defekte Teilstück wird durch Endonucleasen angeschnitten und durch Exonucleasen herausgeschnitten.
3. Die entstandene Lücke wird durch Polymerase und Ligase geschlossen.
4. Wiederhergestellte normale DNS-Konfiguration.

Haynes (37), Howard-Flanders (4o) und Setlow und Carrier (75) schlugen 1965 auf der Konferenz für Strahlen - Mikrobiologie zwei Modelle der Dunkelreparatur vor:

1. "cut and patch"-Hypothese (Schneid-und Flickreparatur)
2. "patch and cut"-Hypothese (Flick- und Schneidreparatur)
Für die "cut and patch"-Hypothese gilt die oben aufgeführte schematische Darstellung. Bei der zweiten Hypothese, die heute als die wahrscheinlichere gilt, wird vermutlich die Bildung eines längeren Einzelstranges umgangen, indem ein Reparaturkomplex aus Nuclease und Polymerase gebildet wird. Nach dem Einschnitt der Endonuclease erfolgt die Reparatursynthese in einem Arbeitsgang, wobei der defekte Strang "zurückgeschält", abgeschnitten und weiter degradiert wird, während gleichzeitig ein neuer DNS-Strang synthetisiert wird.

Kneser, Metzger und Sauerbier (46) konnten zeigen, daß es sich bei der Photoreaktivierung und bei der Dunkelreparatur um zwei verschiedene Mechanismen handelt. In ihren Versuchen wiesen sie nach, daß die Photoreakti - vierung im Gegensatz zur Dunkelreparatur auch in Gegenwart von Coffein abläuft.

## 4. UV-Schäden und Reparaturprozesse in Säugetierzellen

### 4.1. Photoreaktivierung und Excisionsreparatur

Für Bakterien und andere niedere biologische Systeme wurden zwei Arten von Reparaturprozessen zur Eliminierung von Pyrimidin-Dimeren beschrieben, die Photoreaktivierung und die Excisionsreparatur. Bei den Säugetierzellen konnte bisher eine Reparatur durch Photoreaktivierung nicht beobachtet werden. Die Excisionsreparatur tritt häufig bei Zellen von Menschen oder anderen Primaten auf. Regan, Trosko und Carrier (65) wiesen bei RA- (recovered amnion), RA X1o (durch Röntgenstrahlen mutierte RA-Zellen), HeLa- und WI-38-Zellen nach, daß 5o % des induzierten dimeren

Thymins bei anschließender Inkubierung wieder eliminiert wurde. Untersuchungen von Trosko und Kasschau (85) dagegen zeigten, daß Dimere, die in chinesischen Hamsterzellen erzeugt wurden, innerhalb von 48 Stunden nach der Bestrahlung nicht excisiert wurden, obwohl die DNS-Synthese nicht zum Erliegen kam. Auch Forschungen von Trosko, Chu und Carrier (1965), Klimek und Vlasinova (1966), Cleaver und Trosko (1969) ergaben, daß Nagetierzellen nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil in der Lage sind, Dimere zu excisieren.

Bei neueren Untersuchungen wurde von Setlow, Regan und Carrier (76) festgestellt, daß normale menschliche Zellen etwa 8o% der Thymin-Dimeren excisieren, bei CHEF 125-Hamsterzellen wurden etwa 4o% excisiert und bei Maus 3T3 gilt das für etwa 1o% der Dimeren. Dagegen können Schweinenierenzellen und Maus L-Zellen keine Dimeren excisieren.

## 4.2. Reparatur-Replikation und außerplanmäßige DNS-Synthese

Der Terminus Reparatur-Replikation wird benutzt, um die Aufnahme markierter Nukleotide in die DNS von Zellen zu beschreiben, die entweder bestrahlt oder mit alkylierenden Reagentien behandelt wurden (58). Die Reparatur-Replikation ist verschieden von der normalen semikonservativen Replikation und tritt in Zellen auf, die nicht in der Synthesephase sind ($G_1$ und $G_2$) (6o). Sie wurde durch die Dichtegradiententechnik entdeckt. Schematisch ist die Reparatur-Replikation in Abbildung 4 dargestellt.

Dieses Phänomen wurde zuerst in Bakterien (Pettijohn und Hanawalt 1964) und dann in verschiedenen Säugetierzellen nach UV-Bestrahlung beobachtet. Richtungsweisend war die Arbeit von Rasmussen und Painter (6o), in der die Reparatur von UV-induzierten Schäden in HeLa- und

chinesischen Hamsterzellen nachgewiesen werden konnte. Nach UV-Bestrahlung nahmen 99% aller HeLa-Zellen markiertes Thymidin auf, während es bei der Kontrolle nur 53% waren. 1968 zeigten Cleaver und Painter ebenfalls bei HeLa-Zellen, daß die Reparatur-Replikation schon bei sehr geringen UV-Dosen auftritt. Bei weiteren Untersuchungen beobachtete Cleaver (18), daß auch chinesische Hamsterzellen eine Reparatur-Replikation durchführen. Sie beginnt bei den Hamsterzellen sofort nach der Bestrahlung und nimmt dann stetig ab. Nach 4 Stunden ist sie zu etwa 5o% vollzogen.

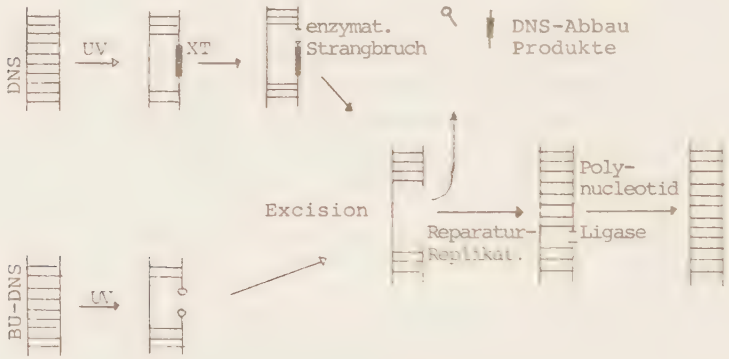



Abb. 4: Reaktionsschema der Reparatur strahleninduzierter Basenschäden und Einzelstrangbrüche
Es sollen nur die zur Reparatur notwendigen Schritte, nicht jedoch alle biochemischen Reaktionen aufgezeigt werden.

A. Basenschäden durch UV in normaler DNS
B. Strangbrüche in 5-BU-substituierter DNS
(nach Cleaver (14))

M.Fox und B.W.Fox demonstrierten die Reparatur-Replikation bei einer Reihe von Tumor-Zellstämmen von Nagetieren. Sie stellten fest, daß bei den gleichen Versuchsbedingungen die Größe der beobachteten Reparatur-Replikation bei den Nagetierzellen geringer war als bei HeLa-Zellen (31).

Von Richold und Arlett (66), die die Reparatur-Replikation bei chinesischen Hamsterzellen und HeLa-S3-Zellen untersuchten, wurde bewiesen, daß das Ausmaß der Replikation nicht von der UV-Dosis abhängig ist. Außerdem beobachteten sie eine Wechselwirkung zwischen der Reparatur-Replikation und der außerplanmäßigen DNS-Synthese. Als "außerplanmäßige DNS-Synthese" wird jeder DNS-Synthesevorgang bezeichnet, der außerhalb der S-Phase (DNS-Synthesephase) abläuft (14).

Der Nachweis der außerplanmäßigen DNS-Synthese ist mit Hilfe der Autoradiographie oder durch Erfassung der Einbaurate in die Zellen zu erreichen, bei denen die normale DNS-Synthese gehemmt ist. Arbeiten von Painter und Cleaver (11,12,14,18,56) und Smets (79) weisen darauf hin, daß vermutlich jede Form der strahleninduzierten DNS-Synthese durch Einbau von DNS-Vorstufen in bereits ausgebildete Stränge erfolgt, so daß wahrscheinlich mit verschiedenen Methoden der gleiche Prozeß nachgewiesen wird (2). Dafür spricht auch, daß weder Reparatur-Replikation noch außerplanmäßige DNS-Synthese durch Oxyharnstoff (HU) gehemmt werden, während die semikonservative Replikation in Gegenwart von HU fast völlig zum Erliegen kommt (3,15, 68,1oo).

Bei UV-bestrahlten Xeroderma-pigmentosum-Zellen (XP) konnte Cleaver (14) nachweisen, daß sie nicht zur Reparatur-

Replikation befähigt sind, während in 5-BU-substituierten XP-Zellen nach UV-Bestrahlung eine Reparatur-Replikation stattfand. Da UV-Strahlung in 5-BU-substituierter DNS durch Basenschädigung zu Einzelstrangbrüchen führt (22), kann geschlossen werden, daß für die Excision von Pyrimidin-Dimeren aus UV-bestrahlter DNS in Säugetierzellen ebenso wie in Bakterien zwei Enzyme benötigt werden:eine Endonuclease, die die UV-bestrahlte DNS angreift und die Ausbildung von Einzelstrangbrüchen in der Nähe der Basenschäden katalysiert, und eine Exonuclease, die die Strangunterbrechungen angreift und die Pyrimidin-Dimeren aus der DNS freisetzt (9,42).

Für die XP-Zellen bedeutet das, daß zwar die Exonucleasewirkung in den Zellen vorhanden ist, aber die Endonucleasewirkung fehlt.

Einen direkten Nachweis für zwei DNS-spezifische Exonucleasen konnte 1971 Lindahl (53) erbringen. Er isolierte aus Kaninchenleber-Nuclei die Desoxyribonucleasen III und IV. Bei den in vitro-Versuchen erwies sich die DNase IV als sehr wirksam bei der Freisetzung von Pyrimidin-Dimeren, während die DNase III nur eine schwache Wirkung hatte. Die Excision erfolgte aus Polydesoxynucleotiden und ausisolierter DNS in Form von Dimeren enthaltenden Oligonucleotiden. Bei keiner der Exonucleasen konnte eine Hemmwirkung durch Coffein festgestellt werden.

Eine Arbeit von Gautschi und Cleaver (33) handelt von den bei der Reparatur-Replikation beteiligten Enzymen. Bei UV- oder Röntgen-bestrahlten HeLa- und CHO-Zellen stellten sie fest, daß eine Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximidin die semikonservative Replikation rapide reduziert, während die Reparatur-Replikation nicht

beeinflußt oder nur gering reduziert wird. Für die Reparatur-Replikation scheint also keine begleitende Proteinsynthese notwendig zu sein. Die an der Reparatur beteiligten Enzyme müssen daher eine relativ lange Lebensdauer haben.

## 4.3. UV-Bestrahlung von Säugetieren in vivo

In den letzten Jahren wurde damit begonnen, die Wirkung von UV-Strahlen auf die Haut von Säugetieren auch in vivo zu untersuchen. Epstein et. al.(29) konnte 197o zeigen, daß in der Epidermis von Mäusen innerhalb der ersten Stunden nach der Bestrahlung mit UV-Licht eine Hemmung der Mitose sowie eine Verminderung der DNS-, RNS- und der Proteinsynthese stattfinden. 24 Stunden später hat die Erholung der Zellen begonnen und nach etwa 48-72 Stunden erreichte sie ihren Höhepunkt. Erst nach 7 Tagen waren die Zellen in der Lage, ihre Funktionen normal auszuüben.

Die Bildung von Pyrimidin-Dimeren konnte bis 1972 in extrazellulärer DNS, in Bakterien, Viren, Protozoen, Hefen und in kultivierten Säugetierzellen beobachtet werden. Erst 1972 gelang es Pathak et.al.(57), die in vivo-Entstehung von Thymin-Dimeren in der Haut von Schweinen nach Bestrahlung mit UV-Licht verschiedener Wellenlänge zu zeigen. Eine direkte Beziehung zwischen der Bildung von Thymin-Dimeren und einer carcinogenen Wirkung von UV-Strahlen konnte nicht bewiesen werden.

## 4.4. UV-Bestrahlung von Maus L-Zellen

Neben HeLa- und chinesischen Hamsterzellen gehören die Maus L-Zellen zu den für Forschungszwecke am häufigsten verwandten Säugetierzellkulturen. So wurde

von mehreren Arbeitsgruppen die Wirkung von UV-Strahlen auf diesen Zellstamm untersucht. Klimek und Vlasinova berichteten 1966 über die Entstehung von Pyrimidin-Dimeren in Maus L-Zellen nach Bestrahlung mit UV-Licht. Rauth und Whitmore (62) beobachteten im gleichen Jahr, daß die Zellen zu Beginn der S-Phase besonders UV-strahlungsempfindlich sind, während die Zellen in der späten S-Phase und der $G_2$-Phase widerstandsfähiger sind. Maus L-Zellen, die in der S-Phase mit 4o,1oo bzw. 2oo erg/mm$^2$ bestrahlt wurden, erreichten die Mitose mit einer Verspätung von 1-2, 4 bzw. 1o Stunden. Die Verzögerung ist also dosisabhängig (25).

Durch weitere Versuche konnte Rauth beweisen, daß Maus L-Zellen zu einer Reparatur der Strahlenschäden befähigt sind, die sich mit Coffein hemmen läßt (63). Für diese Reparatur findet kein vermehrter Einbau von Thymidin statt (1o), wie dies bei menschlichen Zellen zu beobachten ist. Eine an die UV-Bestrahlung anschließende Inkubation mit 2 mM Coffein reduziert stark die Kolonieformfähigkeit ( colony-forming ability - CFA) der Zellen, während dies bei unbestrahlten Zellen in geringerem Maße bzw. gar nicht der Fall war (25). Die Inkubation in Coffein-haltigem Medium ist nur direkt nach der Bestrahlung wirksam. 1o Stunden später hat das Coffein nur noch eine geringe Wirkung. Für die Hemmwirkung des Coffeins war ebenfalls der Zeitpunkt der UV-Bestrahlung innerhalb des Zellzyklus von Bedeutung. Bei Bestrahlung in der $G_1$- und in der $G_2$-Phase bewirkt Coffein nur eine geringe Verzögerung des Übergangs der Zellen von $G_1$ zur S-Phase und von $G_2$ zur Mitose. Geringe UV-Dosen (1oo-2oo erg/mm$^2$) in der frühen S-Phase führten dagegen in Gegenwart von Coffein zu einem spezifischen Block beim Durchlaufen der DNS-Synthese-Phase (24).

Von Lehmann (51) wurde 1972 festgestellt, daß die DNS-Synthese in UV-bestrahlten Maus L-Zellen nicht kontinuierlich ablief. Die DNS-Tochterstränge enthielten Lücken, die komplementär zu den Photoprodukten in der Eltern-DNS lagen. Diese Lücken wurden bei Inkubation durch neu synthetisierte DNS gefüllt und nicht durch einen Rekombinationsmechanismus. Der Füllungsprozeß war durch Oxyharnstoff hemmbar und schien von der Eltern-DNS ausgelöst worden zu sein. Die Größe der aufgefüllten Lücken betrug etwa 8oo Nukleotide.

In weiteren Arbeiten wurde festgestellt (32,52), daß dieser Auffüllungsprozeß durch die Gegenwart von Coffein oder Theophyllin spezifisch und total gehemmt wurde. Daraufhin häuften sich innerhalb der DNS in Anwesenheit dieser Stoffe in UV-bestrahlten Zellen Abschnitte an, die niedrige Molekulargewichte hatten, während ohne Coffein die neue DNS nahezu die Größe der unbestrahlten DNS erreichte.

Für weitere Untersuchungen über den Reparaturmechanismus nach UV-Bestrahlung in Maus L-Zellen wurde häufig Coffein benutzt, so daß darüber in einem der folgenden Abschnitte eingehender berichtet werden soll.

## 4.5. UV-Bestrahlung von H.Ep.2-Zellen

Obwohl H.Ep.2-Zellen eine der ältesten Zellkulturen sind, gibt es kaum Untersuchungen über ihr Verhalten gegenüber UV-Licht.

Von Landeck (48) wurde beobachtet, daß H.Ep.2-Zellen einen durch Röntgen- oder UV-Bestrahlung verursachten Schaden

reparieren können. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Coyle und Strauss (19) überein, die mit Hilfe einer Endonuclease aus Micrococcus lysodeicticus die Reparaturfähigkeit dieser Zellen prüften. Die Reparatur der UV-Strahlenschäden war durch Coffein und Oxyharnstoff innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Bestrahlung hemmbar. Bei Schäden durch Röntgenstrahlen war eine Hemmung der Reparatur nur mit HU möglich. Ebenso wie andere menschliche Zellen sind H.Ep.2-Zellen auch zur Excision von Dimeren befähigt (48).

Coyle und Strauss (2o) konnten nachweisen, daß unter dem Einfluß von Oxyharnstoff die DNS-Synthese stark abfällt und die gebildete DNS ein anomal kleines Molekulargewicht aufweist. Als weiteren nicht reparierbaren letalen Schaden nach 24-48 Stunden Einwirkung von Oxyharnstoff wurde das Auftreten von Doppelstrangbrüchen in der DNS von H.Ep.2-Zellen beobachtet.

## 5. Wirkung von Inhibitoren auf UV-bestrahlte Säugetierzellen

Zur Aufdeckung von Reparaturprozessen nach UV-Bestrahlung werden häufig Inhibitoren verwandt. Dazu gehören auch Coffein und Oxyharnstoff.

### 5.1. Wirkung von Coffein auf UV-bestrahlte Säugetierzellen

Die Wirkung des Coffeins wurde hauptsächlich durch Untersuchungen von Mutatationen sowie seines toxischen Verhaltens und der von ihm verursachten strahlensensibilisierenden Wirkung bei Säugetierzellen festgestellt. Nach Domon

und Rauth (24,64) ist eine Coffein-Konzentration bis zu 1 mM nicht toxisch für L-Zellen,aber es sensibilisiert sie gegenüber UV-Licht (52,55) und verschiedene alkylierende Reagenzien (93). Durch eine Inkubation in Coffein-haltigem Medium nach der UV-Bestrahlung wird die CFA bei L-Zellen stark reduziert. Eine spätere Inkubation mit Coffein ist wirkungslos. Der gleiche Effekt wurde früher bei Bakterien festgestellt, die ein Dunkelreparatursystem enthielten. Diese Beobachtung hielt Rauth für den Beweis einer Dunkelreparatur in Säugetierzellen. Der sensibilisierende Effekt findet während der DNS-Synthesephase nach der Bestrahlung statt.

Bei HeLa-Zellen konnte diese Wirkung nicht beobachtet werden (97) und die Berichte über chinesische Hamsterzellen widersprechen sich (1,13,35,67,84). Kuhlmann et al. stellten fest, daß niedrige Dosen Coffein in HeLa-Zellen schon eine Hemmung der RNS-Synthese hervorrufen, aber die DNS-Synthese stimuliert wird.

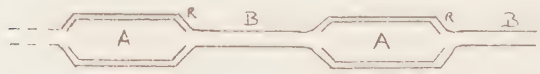
In Konzentrationen von 1-2 mM ist Coffein toxisch für L-Zellen (63), chinesische Hamsterzellen (1,13,84) und HeLa-Zellen (47). Bei HeLa-, chinesischen Hamsterzellen, Leukozyten, menschlichen Embryozellen und Lymphozyten werden in Gegenwart von Coffein während der DNS-Synthesephase Chromosomenabweichungen induziert (44,47,49,96). Die Ergebnisse von Kihlmann et al. weisen auf eine Beziehung zwischen der Wirkung von Coffein auf die Erzeugung von Chromosomenveränderungen und der Wirkung des Coffeins auf den Verlust der Proliferationsfähigkeit hin (44).

Um den Wirkungsmechanismus des Coffeins zu klären, wurden auch Versuche mit isolierter DNS durchgeführt. Ts´o und Lu haben festgestellt, daß denaturierte DNS im Gegensatz zu nativer mit Coffein reagiert (87). Domon et al. beobachteten nach UV-Bestrahlung isolierter DNS

eine Bindung von Coffein an die denaturierten Regionen. Dieses deutet darauf hin,daß Coffein seine Wirkung auf die DNS-Replikation und die CFA durch eine Bindung an die geschädigten Stellen in der DNS ausübt.

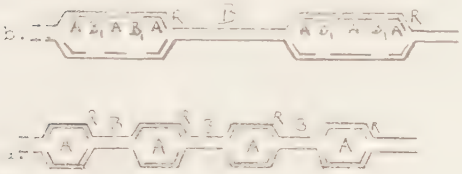
Die verschiedenen Reaktionen auf eine Coffein-Behandlung nach UV-Bestrahlung scheinen auf unterschiedlichen Reparaturmechanismen zu beruhen (32). Bei Nagetierzellen wurde nur eine geringe oder gar keine Excision von Dimeren festgestellt (15,61). Die neu synthetisierte DNS, die in Maus L- oder chinesischen Hamsterzellen durch semikonservative Replikation gebildet wurde, enthält Lücken, die gegenüber den Dimeren in den Eltern-Strängen liegen. Diese Lücken werden bei weiterer Inkubation durch einen Prozeß gefüllt, der eine de novo DNS-Synthese auszulösen scheint. Dieser lückenfüllende Prozeß (Reparatur.Replikation ?) wird in Maus L-Zellen durch Coffein gehemmt, aber nicht in HeLa-Zellen (Cleaver/Thomas 1969, Fuyiwara/Kondo 1972).

Untersuchungen über die DNS-Synthese von Lehmann führten zu anderen Ergebnissen als die oben erwähnten Versuche von Fuyiwara und Kondo. Es wird angenommen, daß replizierende DNS folgende Struktur hat (5o):




Obwohl Coffein in einer Konzentration von 1,6 mM bei Maus L-Zellen keine Strangbrüche erzeugt, wurde bei Pulselabeling-Experimenten festgestellt, daß die DNS-Stränge, die in seiner Gegenwart synthetisiert wurden, kleiner sind als die in seiner Abwesenheit synthetisierten. Als Erklärung bieten sich zwei Möglichkeiten an:

a. die DNS wurde in kürzeren Replikationseinheiten hergestellt,
b. in den Tochter-DNS-Strängen sind inmitten der normalen Replikationseinheiten Lücken vorhanden (5o).



$B_1$ - Lücken

R - Replikationspunkt

Die Ergebnisse von Lehmann sprechen für Modell a., während sich die Resultate von Fuyiwara und Kondo durch Modell b. erklären lassen.

In seiner Arbeit (5o) schlug Lehmann auch ein umfassendes Modell für die Wirkung von Coffein vor:
Er ging davon aus, daß der DNS-Replikationspunkt in einer Region der partiellen Denaturierung liegt, so daß die Wahrscheinlichkeit besteht, daß Coffein dort angreift. Es verursacht einen vorzeitigen Ablauf der DNS-Synthese sowie einen Synthesebeginn nicht am Ende des Stranges sondern an anderer Stelle. Die würde eine DNS ergeben, die in kleineren Einheiten synthetisiert ist. Die Coffein-Wirkung wäre konzentrationsabhängig. Bei höheren Coffein-Konzentrationen kann diese anomale Synthese schädlich sein und zu Chromosomenschäden sowie zum Zelltod führen (47). In UV-bestrahlten Zellen bleiben während der DNS-Synthese Lücken von ca. 8oo Nukleotiden gegenüber den nicht excisierten Dimeren, so daß Coffein mit großere Wahrscheinlichkeit dort angreift. Die könnte eine Verringerung des lückenfüllenden Prozesses bewirken. Einen Beitrag zur Klärung dieser Coffeinwirkung wurde von Cleaver und Thomas erbracht(16).

Es könnte auch für die strahlensensibilisierende Wirkung in Nagetierzellen sprechen. Menschliche Zellen sind zu einer Excision der Dimeren fähig, so daß der postreplikative lückenfüllende Prozeß von geringerer Bedeutung ist. Damit könnte erklärt werden, warum HeLa-Zellen durch Coffein nicht gegen UV-Licht sensibilisiert werden (97). Die Erzeugung von Einzelstrangbrüchen, entweder durch $\gamma$-Strahlen oder durch Einschnitte neben Dimeren nach UV-Bestrahlung in excisionsfähigen Zellen könnte Einzelstrangregionen verursachen, aber nur wenige Nukleotide lang. Strangbruchverbindung, Excision von Dimeren und Reparatur-Replikation sind unempfindlich gegen Coffein.

## 5.2. Wirkung von Oxyharnstoff auf UV-bestrahlte Säugetierzellen

Oxyharnstoff gehört zu den DNS-Synthesehemmern, die in die Reaktionswege der Nukleosidtriphosphat-Synthese eingreifen (34). Es beeinflußt die DNS-Synthese wahrscheinlich durch die Hemmung der Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase (54,94). Diese Hemmung führt wiederum zu einem Mangel an Desoxynucleotid-Vorstufen.

Bei chinesischen Hamsterzellen erfolgte nach kurzer Zeit eine Abtötung, wenn die Zellen während der DNS-Synthesephase mit Oxyharnstoff inkubiert wurden (78). Coyle und Strauss (2o) gelang bei H.Ep.2-Zellen der Nachweis, daß unter dem Einfluß von HU die Syntheserate stark abfällt und die gebildete DNS ein anomal kleines Molekulargewicht aufweist. Landeck (48) beobachtete bei H.Ep.2-Zellen eine Hemmwirkung durch HU nach UV- und Röntgenbestrahlung.

HeLa-Zellen werden in ihrer Lebensfähigkeit erst angegriffen, wenn die Inkubation mit Oxyharnstoff während einer Generationszeit oder länger erfolgt(59,68,89,1oo). Cleaver stellte fest, daß die semikonservative Replikation bei HeLa-Zellen gehemmt wird, aber nicht die Reparatur-Replikation (12). Neuere Untersuchung von Ben-Hur und Ben-Ishai haben aber ergeben, daß in Gegenwart von HU innerhalb von 8 Stunden Strangbrüche nicht wieder verbunden werden, während ohne Oxyharnstoff eine Verbindung in 9o Minuten stattfindet. Diese Hemmung der Reparatur konnte rückgängig gemacht werden durch eine Mischung aller vier Desoxyribonucleoside in einer Konzentration, die nicht die Hemmung der totalen DNS-Synthese rückgängig machte (4). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß verschiedene Enzymsysteme an der semikonservativen DNS-Synthese und der Reparatur-Replikation beteiligt sind. In diesem Fall könnte eine Selektivität für die semikonservative Replikation gegenüber der Reparatur-Replikation erwartet werden, wenn die Enzyme eine unterschiedliche Affinität zu den Substraten haben.

## B. ZIEL DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

In der vorliegenden Arbeit soll festgestellt werden, ob zwischen Nagetierzellen (Maus L) und menschlichen Zellen (H.Ep.2) Unterschiede in der Reparatur-Replikation nach UV-Bestrahlung bestehen. Dazu war die TDR-$^{3}$H-Aufnahme in die Zellen als Indikator für die DNS-Synthese zu messen. Andererseits sollte durch die Abgabe von TDR-$^{3}$H aus markierten und UV-bestrahlten Zellen ein Hinweis auf vorhandene Excisions-Reparaturmechanismen erhalten werden.

Weiterhin ist zu klären, in welchem Ausmaß die Reparatur-Replikation durch Oxyharnstoff oder Coffein beeinflußt werden kann, wobei die beiden Zellarten zu vergleichen sind.

Es soll überprüft werden, welchen Einfluß unterschiedliche Inkubationstemperaturen nach der UV-Bestrahlung auf die Reparatur-Replikation haben.

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Coffein bei der Reparatur-Replikations-Hemmung. soll versucht werden, möglichst große Mengen an Coffein-$^{14}$C in die Zellen einzubringen.

# C. Material und Methodik

## 1. Ursprung und Haltung der Gewebekulturen

Es wurden zwei Zellreihen untersucht, Maus L 929- und H.Ep.2-Zellen. Die H.Ep.2-Zellen wurden 1952/53 von Fjelde (3o) von einem an Larynx-Carcinom erkrankten Patienten gewonnen und seitdem in ständiger Kultur gehalten. Der Zellstamm wurde uns von Prof.Dr.K.O.Habermehl, Institut für klinische und experimentelle Virologie der DFG, Berlin,zur Verfügung gestellt. Maus L 929-Zellen sind normale Fibroblasten, die 1972 von der Fa. Bio-Cult, Glasgow erworben wurden.

### 1.1. Herstellung des Kulturmediums und Züchtung der Zellen

Beide Zellreihen wurden in Eagle's "minimal essential medium" (28) mit Glutaminsäure und nicht-essentiellen Aminosäuren (Grand Island Biological Comp.,N.Y.) mit einem Zusatz von 1o% Hitze-inaktiviertem Kälberserum (Bio-Cult,Glasgow) gezüchtet. Das Inaktivieren des Serums erfolgte durch 3ominütiges Erhitzen im Wasserbad auf 56° C. Außerdem erhielt das Medium einen Zusatz von 1oo I.E./ ml Penicillin-G-Na und 1oo µg/ml Streptomycinsulfat (Farbwerke Hoechst). Der pH-Wert des Mediums wurde nach Zusatz von 2,2 g/l Natriumhydrogenkarbonat mit 1 n-Salzsäure auf 6,8 -7 eingestellt. Anschließend wurde das Medium mit Membranfiltern (Porenweite o,2 ;Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert.

Die Züchtung der beiden Zellreihen erfolgte in Vierkant-Gewebekulturflaschen von 16 $cm^2$ Grundfläche bei $36^{\circ}$ C ohne zusätzliche Begasung. Für die Versuche wurden die Zellen in Glaspetrischalen (Ø 4,5 cm) oder Kunststoffpetrischalen in 5% $CO_2$-haltiger Atmosphäre gezüchtet. Die Inkubationstemperatur betrug $22^{\circ}$ oder $36^{\circ}$ C.

Alle 2-3 Tage wurden die Zellen passagiert oder es wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei der Passage erfolgte in der Regel eine Verdünnung der Zellen 1:3. Zur Aufarbeitung für die Radioaktivitätsmessungen und für die Passage wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Trypsin-AeDTA-Lösung abgelöst (Trypsin, Nutritional Biochemical Corp., Cleveland USA). Anschließend wurde die Suspension 5 Minuten bei 2ooo U/min zentrifugiert und in Medium resuspendiert.

1.2. Herstellung der Trypsin-AeDTA-Lösung

a. Zusammensetzung der phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS):

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 8,o | g |
| KCl | o,2 | g |
| $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ | 1,15 | g |
| $KH_2PO_4$ | o,2 | g |
| $MgCl_2$ | o,1 | g |
| $CaCl_2$ | o,1 | g |
| Aqua dest. ad | 1ooo,o | ml |

$MgCl_2$ und $CaCl_2$ wurden getrennt von den übrigen Substanzen in 5o ml Aqua dest. gelöst, um eine Fällung unlöslicher Phosphate zu vermeiden, und vor der Sterilfiltration zugegeben.

b. Zubereitung der Trypsin-AeDTA-Lösung
Für die Herstellung von einem Liter Trypsin-AeDTA-Lösung wird 1g Trypsin in 1oo ml PBS 15 Minuten bei 37° C im Brutschrank gerührt und anschließend 2o Minuten bei 3ooo U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit PBS auf 975 ml aufgefüllt. Nach Zusatz von 25 ml o,1 M AeDTA-Lösung (Titriplex III, Merck) wurde die Trypsin-AeDTA-Lösung membranfiltriert und in kleine Flaschen für den einmaligen Gebrauch abgefüllt.

## 2. Sterilitätskontrollen

Zur Erkennung von mikrobiellen Verunreinigungen, die zu Fehlinterpretationen führen könnten, wurden sowohl die Zellkulturen als auch die hergestellten Lösungen den Sterilitätskontrollen des DAB 7 unterworfen. Außer Thioglykolatbouillon wurde auch Leberbouillon verwandt. Zur Überprüfung auf Mycoplasmen wurde bei den Zellen eine Orceinfärbung durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit Essigsäure auf einem Deckglas fixiert und mit 1%iger Orceinlösung gefärbt. Bei dieser Methode lassen sich unter dem Mikroskop Mycoplasmen an der Zellwand erkennen. Bei Verdacht einer Infektion wurden die Zellkulturen verworfen und durch frische Zellen ersetzt.

## 3. Bestrahlung mit UV-Licht

### 3.1. UV-Dosimetrie

Als UV-Strahlenquelle wurde eine Quecksilberniederdruck-Lampe (NK 3o/89-Pl 39o, Fa.Hanau, 254 nm) verwandt. Die UV-Dosimetrie wurde von Hartmann (36) durchgeführt. Die Meßmethode beruht auf einer Umwandlung von UV-Licht in eine Fluoreszenzstrahlung. Die Fluoreszenzstrahlung wurde photoelektrisch gemessen. Es wurden folgende Werte

übernommen:

| | | |
|---|---|---|
| Lampenabstand | 1o cm = 271 | erg/mm$^2$ x sec |
| | 7o cm = 37,4 | erg/mm$^2$ x sec |
| | 14o cm = 11,95 | erg/mm$^2$ x sec |

### 3.2. Bestrahlung der Zellen

Für die Bestrahlung der Zellen wurde das Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit je 2 ml PBS (H.Ep.2) bzw. isotonischer Kochsalzlösung (Maus L) gewaschen. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur ohne Flüssigkeit mit 11,95 erg/mm$^2$ x sec bestrahlt.

## 4. Anwendung von Chemikalien

### 4.1. Inhibitoren

Als Hemmstoffe wurden Coffein (Calbiochem, Los Angeles, USA) und Oxyharnstoff (schuchardt,München) verwandt. Die Substanzen wurden kalt in destilliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert. Die Lösungen wurden stets vor Gebrauch frisch hergestellt.

### 4.2. Enzyme und andere Chemikalien

Zur Förderung der Coffein-Aufnahme durch die Zellen wurden dem Medium bei einigen Versuchen Enzyme zugesetzt: RDE - receptor destroying enzyme (Behringwerke AG, Marburg), Lysozym und c-AMP (Serva, Heidelberg). Bei der Züchtung der Zellen als Suspensionskultur erfolgte ein Zusatz von Pluronic F 68 (Wyandotte, Michigan USA; in der BRD unter der Bezeichnung CFV/P-HM2 bei der Fa. BASF, Ludwigshafen erhältlich).

## 5. Radioaktive Markierung der Zellen

Bei den Versuchen zur Coffein-Aufnahme der Zellen wurden diese bis zu 6 Tagen mit Coffein-1-methyl-$^{14}$C (4,4 mCi/mM, New England Nuclear, Boston) inkubiert.

Die Markierung mit $^{3}$H-TDR (methyl-$^{3}$H-)-haltigem Medium bzw. anderen Lösungen dauerte 3-2o Stunden (Radiochemical Center, Amersham, 27,8 Ci/mM, Endkonzentration 1-3 $\mu$Ci/ml). Bei den Versuchen zum DNS-Abbau wurde das radioaktive Medium 3o Minuten vor der UV-Bestrahlung durch inaktives ausgetauscht.

## 6. Radioaktivitätsmessung

### 6.1. Aufarbeitung der Zellen

Zur Bestimmung des $^{14}$C-Coffein- bzw. des $^{3}$H-TDR-Gehaltes der Zellen wurden diese trypsiniert und zweimal mit je 5 ml Medium gewaschen und zentrifugiert. Der Rückstand wurde in o,5 ml PBS (H.Ep.2) bzw. isotonischer Kochsalzlösung (Maus L) aufgenommen. Davon wurden zweimal o,1 ml als Meßprobe verwandt und o,2 ml mit 1o%iger Trichloressigsäurelösung (TCE) 45 Minuten bei 4$^{o}$ C extrahiert. Der TCE-Extrakt wurde durch Zentrifugation abgetrennt und für 2 Messungen benutzt. Der Rückstand, die säureunlösliche Fraktion wurde in o,2 ml der entsprechenden Salzlösung aufgenommen und ebenfalls gemessen. Alle Proben wurden in 1o,o ml Insta-Gel (Packard, Frankfurt/M.) gemessen.

### 6.2. Meßgeräte

Die Messung der Proben erfolgte vollautomatisch in einem Liquid Szintillation Analyzer (Philips, Eindhoven) bei

8 - 9 $^{o}$ C. Dabei werden die durch Radio-Isotopen (oder ionisierende Strahlen) im Szinillations-Gel verursachten Lichtblitze durch einen Photomultiplier registriert und in elektrische Impulse umgewandelt. Die automatische Quenchkorektur wurde sowohl für Coffein-$^{14}$C als auch für $^{3}$H-TDR mit einer Kurve zweiten Grades durchgeführt:

$$E = Px^2 + Qx + R$$

für $^{3}$H-TDR : P = - o,68 Q = + 1,31 R = - o,19

für Coffein-$^{14}$C: P = -1,64o Q = +2,349 R = +o,o17

Für eine Impulsrate von 1o$^{4}$ dpm beträgt der Meßfehler 1%.

Die Messung der Radioaktivitätsverteilung des Coffein-1-methyl-$^{14}$C erfolgte mit einem Dünnschichtscanner der Fa.Berthold-Frieseke, Karlsruhe-Durlach, in Verbindung mit dem Strahlenmeßgerät FH 49 A und einem Potentiometerschreiber der Fa.Frieseke u.Höpfner, Erlangen. Als Zählgas wurde eine Mischung aus 1o% Methan und 9o% Argon verwandt.

## 7. Synchronisation der Zellen

Nach der Passage wurden die Zellen für 72 Stunden bei 36$^{o}$ C inkubiert. Anschließend wurde das Medium ausgetauscht und mit 7,5 mM Thymidin versetzt (Nutritional Biochemical Corp.Cleveland, USA). Nach 24stündiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und weitere 14 Stunden inkubiert. Darauf folgte eine erneute Inkubation mit 7,5 mM Thymidin für 24 Stunden.

# D. ERGEBNISSE

## 1. Untersuchung der Aufnahme von Coffein

Da Coffein in der Lage ist, bei verschiedenen Zellarten die Reparatur nach UV-Bestrahlung zu hemmen, wurde zu Beginn der Arbeit versucht, eine Aussage über den Wirkungsmechanismus des Coffeins in H.Ep.2- und Maus L-Zellen zu machen.

### 1.1 Radioaktivitätsverteilung des Coffeins

Die radiochemische Reinheit des Coffein-1-methyl-$^{14}C$ wurde papierchromatographisch geprüft. Die Papierchromatographie erolgte in dem System :

n-Butanol : Eisessig : Wasser = 25o : 4o : 1oo .

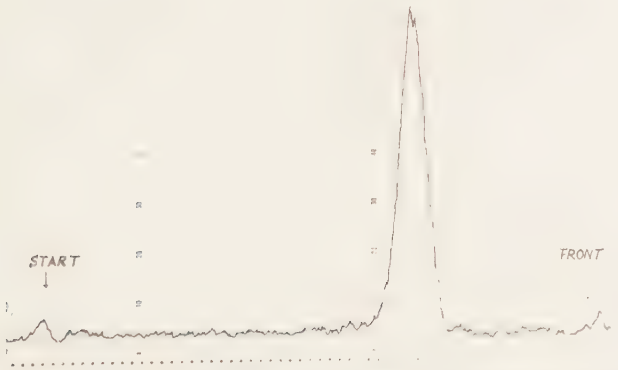



Abb. 5: Aufzeichnung der Radioaktivitätsverteilung von Coffein auf dem Chromatogramm

Die Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm wurde mit dem Dünnschichtscanner gemessen.

| | |
|---|---|
| Hochspannung | 17oo Volt |
| Eingangsempfindlichkeit | 25o mV |
| Dämpfung | 12o sec |
| Vorschub | 16 mm/h |

Das Transportgerät und der Schreiberstreifen hatten die gleiche Vorschubgeschwindigkeit.

Die Radioaktivitätskurve wurde gravimetrisch ausgewertet. Dazu wurden die "Peaks" ausgeschnitten und gewogen. Die Summe der "Peaks" wurde als 1oo% angesetzt, die sich auf reines Coffein-1-methyl -$^{14}$C und dessen Abbau-Produkte verteilten. Auf das reine Coffein-$^{14}$C entfielen 98% der Gesamtaktivität.

### 1.2. Abhängigkeit der Coffein-Aufnahme von der Inkubationszeit

Um den Wirkungsmechanismus des Coffeins auf UV-bestrahlte Zellen untersuchen zu können, war es notwendig, eine möglichst hohe Einbaurate von Coffein-1-methyl-$^{14}$C zu erzielen. Entsprechend den Angaben von Domon und Rauth (24) wurden die Versuche zunächst mit einem Gemisch von radioaktivem und inaktivem Coffein (Coffein$^{+}$) bei einer Gesamtkonzentration von 2 mM durchgeführt.

Zur Untersuchung der Coffein-Aufnahme wurden gleiche Teile einer Zellsuspension (ca.2 x 1o$^{5}$ Zellen) in kleine Glaspetrischalen (Ø 4,5 cm) gegeben und 24 Stunden inkubiert, um eine Anheftung und 1-2 Teilungen zu ermöglichen. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen für verschiedene Zeiträume mit 2 mM Coffein$^{*}$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und wie unter 6.1.

angegeben für die Messungen und Zählungen verwandt.

Abbildung 6 zeigt die Coffein*-Aufnahme von H.Ep.2 - Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Coffein. Die Zellen wurden nach der Vorinkubation bis zu 6 Tagen mit Coffein inkubiert. Nach 3 Tagen ist deutlich ein Maximum der Aufnahme zu erkennen. Der Abfall der Kurve nach diesem Zeitraum beruht vermutlich auf der Hemmwirkung des Coffeins, das schon in einer Konzentration von 2 mM zu einer Minderung des Proliferationsvermögens von etwa 3o% führt (48).

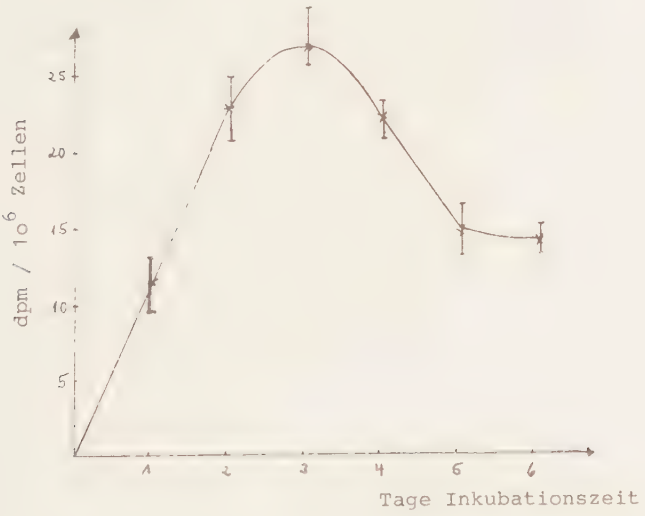



Abb. 6: Coffein*-Aufnahme durch H.Ep.2-Zellen als Funktion der Inkubationszeit mit Coffein
Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus 8 Versuchen dar.
Inkubationstemperatur 36° C

Für Maus L-Zellen wurde der gleiche Versuch mit Inkubationszeiten von 2-72 Stunden durchgeführt. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, erreichen Maus L-Zellen schon nach 48 Stunden das Maximum ihrer Coffein-Aufnahme. Diese Tatsache sowie der starke Abfall der Kurve weisen auf eine größere Coffein-Empfindlichkeit der Maus L-Zellen hin. Vielleicht liegt die Ursache dafür in der größeren Aufnahmefähigkeit der Maus L-Zellen. Ihr Maximum des Coffein-Einbaus ist fast doppelt so groß wie das der H.Ep.2-Zellen.

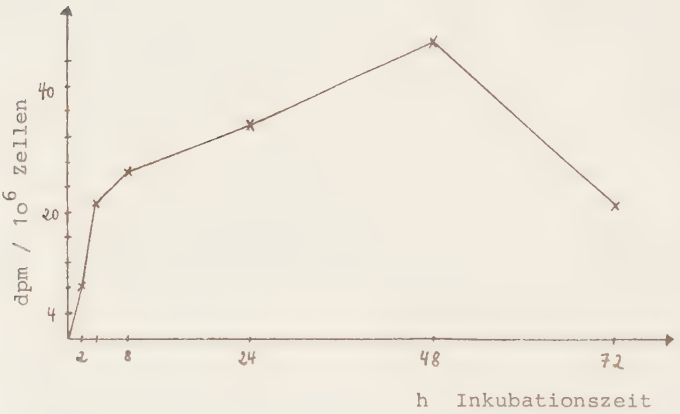



Abb. 7: Coffein*-Aufnahme durch Maus L-Zellen als Funktion der Inkubationszeit mit 2 mM Coffein
Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus 6 Versuchen dar.
Inkubationstemperatur 36 °C

## 1.3. Coffein-Aufnahme in Abhängigkeit von der UV-Dosis

Zur Untersuchung der Coffein-Aufnahme in Abhängigkeit von der UV-Dosis wurden die Zellen mit 2mM Coffein* in einer Vierkant-Kulturflasche 48 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen passagiert und weitere 24 Stunden mit Coffein* in Glaspetrischalen inkubiert. Zur Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt und anschließend durch frisches Medium mit der gleichen Coffein*-Konzentration ersetzt. Die Inkubation nach der Bestrahlung dauerte 48 Stunden. Bei den unbestrahlten Kontrollen wurde ebenfalls ein Mediumwechsel durchgeführt, um einen Fehler durch die Zählung nicht angehefteter Zellen zu vermeiden.

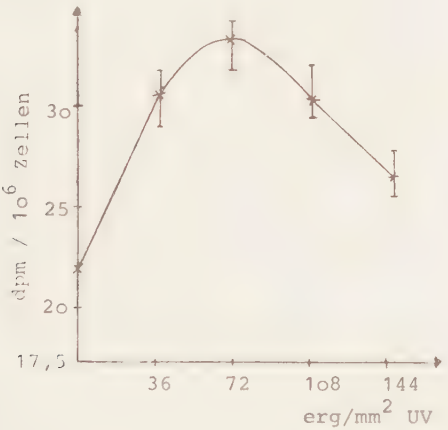



Abb. 8: Coffein*-Aufnahme durch H.Ep.2-Zellen als Funktion der UV-Dosis
Coffein-Konzentration 2 mM
Inkubationstemperatur 36° C

Wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist, erfolgt durch die UV-Bestrahlung nur eine relativ geringe Aufnahmesteigerung. Das Optimum liegt bei ca. 72 erg/mm$^2$ UV-Licht. Größere Strahlendosen führen zu einer Hemmung der Proliferationsfähigkeit, die mit einer Verminderung der Coffein-Aufnahme zu korrelieren scheint.

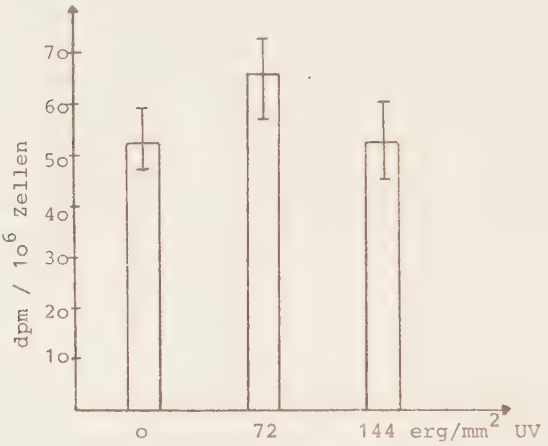



Abb. 9: Coffein*-Aufnahme durch Maus L-Zellen als Funktion der UV-Dosis
Coffein-Konzentration 2 mM
Inkubationstemperatur 36° C

Die Durchführung dieses Versuches mit Maus L-Zellen ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Zellarten (Abb.9). Bei 72 erg/mm$^2$ UV erfolgte ebenfalls eine eine Steigerung des Coffein-Einbaus.

### 1.4. Coffein-Aufnahme in Abhängigkeit von der Coffein-Konzentration

Da die bei einer Coffein-Konzentration von 2 mM erreichten Aufnahmeraten nicht ausreichend waren, wurde der

wurde der Einbau von Coffein-$^{14}$C in Abhängigkeit von der Coffein.Konzentration geprüft.

Die Zellen wurden in Glaspetrischalen (ø 8 cm) gegeben und 24 Stunden mit unterschiedlichen Coffein-Konzentrationen bei 36$^{o}$ C inkubiert. Für die Bestrahlung wurde das Medium entfernt und anschließend durch frisches Medium mit den gleichen Coffein-Konzentrationen ersetzt. Die UV-Dosis betrug für Maus L-Zellen 24o erg/mm$^2$ und für H.Ep.2-Zellen 48o erg/mm$^2$. Nach einer weiteren Inkubation von48 Stunden wurden die Zellen für die Messung aufgearbeitet.

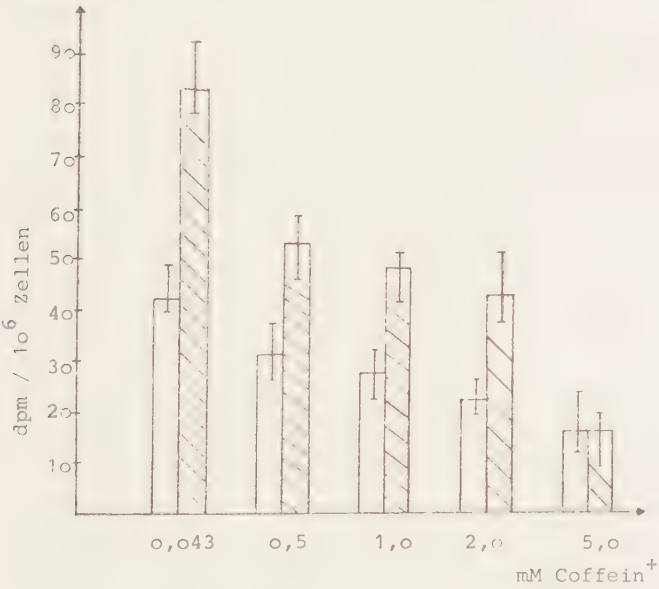



Abb. 1o: Coffein$^*$-Aufnahme nach UV-Bestrahlung als Funktion der Coffein-Konzentration bei Maus L- und H.Ep.2-Zellen
weiße Säule - H.Ep.2-Zellen (48o erg/mm$^2$ UV)
schraffierte Säule - Maus L (24o erg/mm$^2$ UV)

Abbildung 1o zeigt, daß schon eine Coffeinkonzentration von 2mM eine Wachstumshemmung verursacht, die eine niedrigere Coffein-Aufnahme zur Folge hat. Als optimale Konzentration wurde für beide Zellarten o,o43 mM Coffein-$^{14}$C ermittelt. Das ist Konzentration des radioaktiv markierten Coffein-Anteils ohne Zusatz von inaktivem Coffein.

Auch bei dieser Konzentration war die Einbaurate von Coffein nicht groß genug, um den Wirkungsort des Coffeins feststellen zu können. Deshalb wurden verschiedene Versuche zur Penetrationserhöhung von Coffein durch die Zellmembran durchgeführt.

## 1.5. Versuche zur Penetrationserhöhung von Coffein

Aus Versuchen von Landeck (48) war bekannt, daß Dimethylsulfoxid (DMSO) die Permeabilität der Zellwand bei H.Ep.2-Zellen erhöht.

Eine Zugabe von 5 - 2o% Dimethylsulfoxid zum Inkubationsmedium bewirkte nur eine geringe Steigerung der Aufnahmerate von Coffein-$^{14}$C.

Da in der Toxikologie Coffein aus Substanzgemischen am besten bei pH 2 isoliert wird, wurde versucht, das Eindringen von Coffein in die Zelle durch eine pH-Erniedrigung zu erleichtern. Es zeigte sich, daß schon bei einem pH-Wert von 4-5 eine Lysis der Zellen eintritt. Aus dem gleichen Grunde war es nicht möglich, die Aufnahme von Coffein durch Inkubation der Zellen in hypotonischer Salzlösung zu steigern.

Untersuchungen mit Enzymen, die die Zellwand angreifen wie Lysozym, Trypsin und Receptor Destroying Enzyme

führten in höheren Konzentrationen zu einer Schädigung der H.Ep.2-Zellen, in geringerer Konzentration war keine erhöhte Coffein-Aufnahme zu messen. Versuche mit o,1 mM cyclischem Adenosin-3,5-monophosphat (c-AMP)und 1 mM Adenosintriphosphat ergaben eine Verringerung der Coffein-Aufnahme. 1971 hatte Wacker (92a)ähnliche Ergebnisse bei E.Coli erhalten. Bei einer Inkubation von E.coli mit c-AMP wurde die Coffein-Hemmung der Excisionsreparatur aufgehoben. C-AMP und Coffein konkurrieren vermutlich mit den Phosphodiesterase-ähnlichen Enzymen, wobei c-AMP eine größere Affinität zu den Enzymen hat als Coffein.

Um dem Coffein* veränderte Einwirkungsbedingungen zu bieten, wurden die Zellen nicht nur als Zellrasen (mono - layer) sondern auch als Suspensionskultur unter Zusatz von Tween 8o bzw. Pluronic F 68 gezüchtet. Es wurde kein Unterschied zwischen den Einbauraten der beiden Züch - tungsarten beobachtet. Auch eine Synchronisation der Zellen mit Thymidin bewirkte keine Aufnahmesteigerung.

2. Versuche zur Abgabe von $^{3}$H-TDR nach UV-Bestrahlung

Für diese Untersuchungen wurden die Zellen 24 Stunden mit 1 $\mu$Ci/ml $^{3}$H-TDR markiert. Eine Stunde vor der Bestrahlung wurde das radioaktive Medium gegen inaktives ausgetauscht. Die UV-Dosis betrug 24o - 96o erg/mm$^{2}$ . Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 3 Stunden in PBS oder isotonischer Kochsalzlösung bei 22$^{o}$ C inkubiert. Durch die Inkubation in Salzlösung sollte die semikonservative Replikation unterdrückt werden (Liqid-Holding-Phänomen - LH). Bei jeder Versuchsanordnung wurde eine unbestrahlte Kontrolle mit

aufgearbeitet. Die im Inkubationsmedium der unbestrahlten Kontrolle gemessene Radioaktivität wurde von den einzelnen Meßwerten abgezogen und in der graphischen Darstellung gleich Null gesetzt.

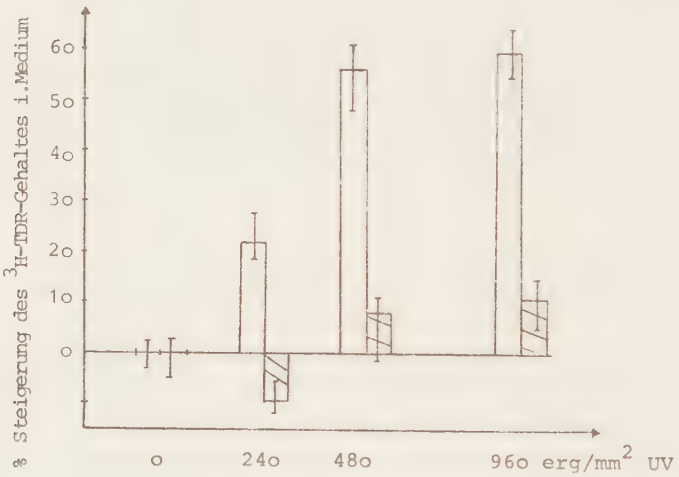



Abb. 11: $^3$H-TDR-Abgabe an das Inkubationsmedium als Funktion der applizierten UV-Dosis bei H.Ep.2- und Maus L-Zellen
Jede Säule stellt den Medianwert aus 7 Versuchen dar.
weiße Säule - H.Ep.2-Zellen
schraffierte Säule - Maus L-Zellen

Das Ausmaß der $^3$H-TDR-Abgabe nach UV-Bestrahlung ist in Abbildung 11 wiedergegeben. Da diese $^3$H-TDR-Abgabe wahrscheinlich mit einer Dimeren-Eliminierung einhergeht, wurde die Inkubationszeit von 3 Stunden nach der Bestrahlung von Landeck (48) übernommen. Er stellte fest,

daß auch bei längerer Inkubation (bis zu 24 Stunden) der Anteil der eliminierten Pyrimidin-Dimeren nur noch geringfügig zunahm.

Bei H.Ep.2-Zellen ist nach UV-Bestrahlung eine deutliche Steigerung der $^{3}$H-TDR-Abgabe festzustellen, die von der Größe der UV-Dosis abhängig ist. Dagegen nimmt bei Maus L-Zellen nach der Bestrahlung die Abgabe von radioaktivem Thymidin an das Inkubationsmedium nicht signifikant zu.

Gleichzeitig mit der Abgabe von radioaktivem Thymidin an das Inkubationsmedium wurde bei H.Ep.2-Zellen nach der Bestrahlung eine Verminderung des $^{3}$H-TDR-Gehaltes in der säureunlöslichen Fraktion festgestellt.

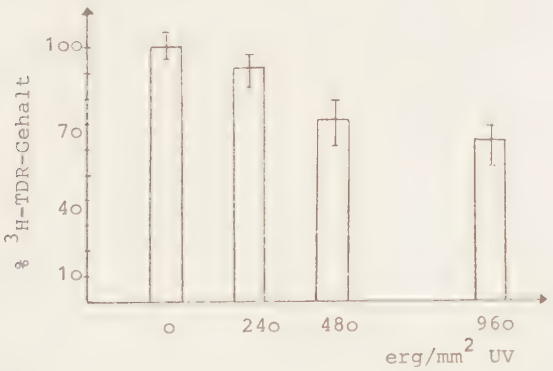



Abb. 12: $^{3}$H-TDR-Gehalt der säureunlöslichen Fraktion von H.Ep.2-Zellen als Funktion der applizierten UV-Dosis
Jede Säule entspricht dem Medianwert aus 7 Versuchen.

## 3. Versuche zur Aufnahme von $^{3}$H-TDR nach UV-Bestrahlung

Die Bestrahlung von Säugetierzellen mit UV-Licht induziert den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin. Dieser Einbau von Thymidin weist auf einen Prozeß zur Reparatur des Strahlenschadens hin. Durch Variation der UV-Dosis, der Inkubationstemperatur sowie der Inkubationszeit und durch die Einwirkung von Coffein bzw.Oxyharnstoff wurde eine Klärung dieses Reparaturprozesses angestrebt.

### 3.1. Abhängigkeit der $^{3}$H-TDR-Aufnahme von der Inkubationszeit nach der UV-Bestrahlung

Es ist bekannt, daß die Reparatur des Strahlenschadens bei Säugetierzellen in den ersten Stunden nach der UV-Bestrahlung abläuft (18). Um eine optimale Aufnahme an Thymidin zu erzielen, wurden die Zellen im Anschluß an die Bestrahlung für verschiedene Zeiten mit $^{3}$H-TDR-haltiger Salzlösung inkubiert.

Nachdem die Zellen 72 Stunden in kleinen Petrischalen bei 36° C kultiviert worden waren, wurde das Medium entfernt und die angehefteten Zellen bestrahlt. Die UV-Dosis betrug 600 erg/mm$^{2}$ für Maus L-Zellen und 960 erg/mm$^{2}$ für H.Ep.2-Zellen. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 22° C in der entsprechenden $^{3}$H-TDR-Salzlösung wurden die Zellen aufgearbeitet und der Gehalt an radioaktivem Thymidin gemessen.

Abbildung 13 zeigt sowohl für H.Ep.2- als auch für Maus L-Zellen ein Optimum der Aufnahme von $^{3}$H-TDR nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Bei Maus L-Zellen ist die

Thymidin-Aufnahme nach einer Inkubationszeit von 1-3 Stunden wesentlich höher als bei H.Ep.2 Zellen.

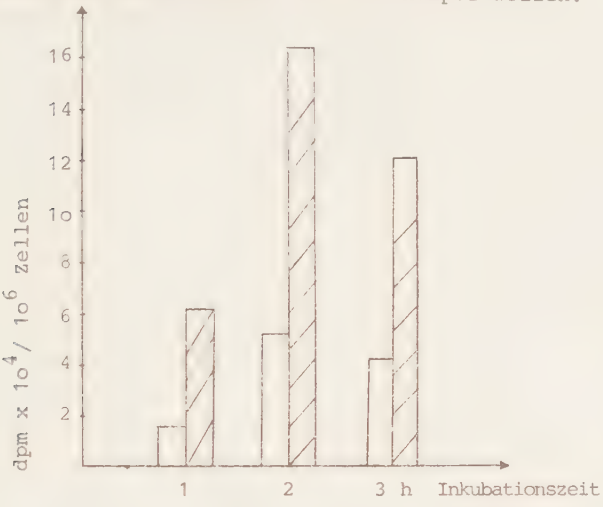



Abb. 13: $^{3}$H-TDR-Aufnahme als Funktion der Inkubationszeit nach der UV-Bestrahlung bei H.Ep.2- und Maus L-Zellen
Inkubationstemperatur 22° C
weiße Säule - H.Ep.2-Zellen (960 erg/mm$^2$)
schraffierte Säule - Maus L (600 erg/mm$^2$)

Zur Festlegungung der UV-Dosen von 960 erg/ mm$^2$ bzw. 600 erg/mm$^2$ siehe Abbildung 14 und 16.

## 3.2. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des $^{3}$H-TDR-Einbaus nach UV-Bestrahlung wurden H.Ep.2- bzw. Maus L-Zellen in Konzentrationen von ca. 2 x 10$^5$ Zellen pro Petrischale ( Ø 4,5 cm) eingesät und 48 Stunden bei 36°C

inkubiert. Zum Bestrahlen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit PBS bzw. isotonischer Kochsalzlösung gespült. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in 2 ml PBS oder Kochsalzlösung mit 1 $\mu$ Ci / ml $^3$H-TDR bei 22° oder 36° C inkubiert und anschließend für die Messung aufgearbeitet.

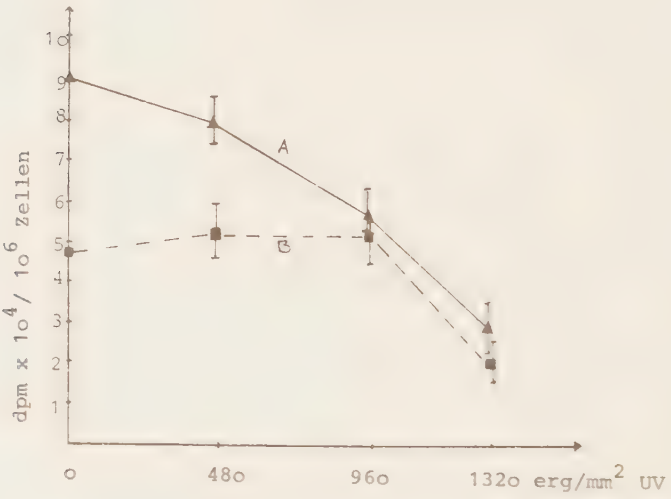



Abb. 14: Einfluß der Inkubationstemperatur auf den $^3$H-TDR-Einbau in H.Ep.2.-Zellen nach UV-Bestrahlung
Jede Kurve stellt die Medianwerte von 8 Versuchen dar.
Kurve A - Inkubationstemperatur 36° C
Kurve B - Inkubationstemperatur 22° C

In Abbildung 14 ist die Temperaturabhängigkeit der $^3$H-TDR-Aufnahme von H.Ep.2-Zellen nach UV-Bestrahlung wiedergegeben. Während bei einer Inkubationstemperatur von 36° C eine deutliche Abnahme des $^3$H-TDR-Einbaus zu

erkennen ist, bleibt die Einbaurate bei 22° C für UV-Dosen bis 960 erg/ $mm^2$ nahezu konstant und fällt erst bei höheren Dosen ab. Dieser Unterschied kann in der säureunlöslichen Fraktion (Abb.15) nicht beobachtet werden. Der Kurvenverlauf für die Inkubationstemperaturen von 22° und 37° C ist beinahe identisch.Der Thymidin-Einbau nimmt bei beiden Temperaturen mit steigender UV-Dosis ab.

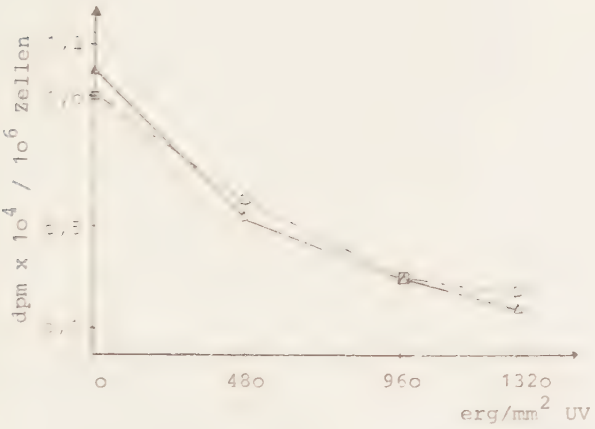



Abb. 15: Einfluß der Inkubationstemperatur auf den $^3$H-TDR-Einbau in die säureunlösliche Fraktion von H.Ep.2-Zellen (Inkubationszeit 2 h)
– – – – Inkubationstemperatur 22° C
———— Inkubationstemperatur 37° C

Der Einbau von radioaktivem Thymidin nach UV-Bestrahlung durch Maus L-Zellen bei 22° und 37° C ist in Abbildung 16 dargestellt. Im Gegensatz zu den H.Ep.2-Zellen

erfolgt bei den Maus L-Zellen bei 22° C eine erhebliche Steigerung der Thymidin-Aufnahme bis zu einer UV-Dosis von 6oo erg/mm$^2$ . Eine Inkubation bei 37° C bewirkt eine geringe Abnahme der Einbaurate nach der Bestrahlung. Anscheinend wird der Einbau von radioaktivem Thymidin und damit die Reparatur des Strahlenschadens durch die erniedrigte Inkubationstemperatur gefördert.

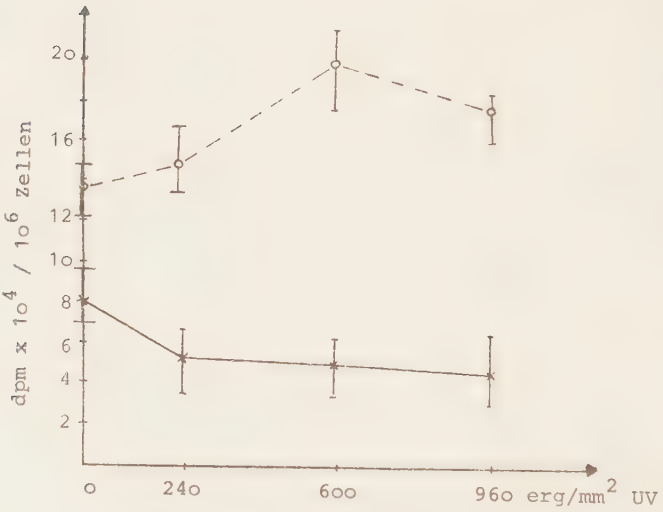



Abb. 16: Einfluß der Inkubationstemperatur auf den $^3$H-TDR-Einbau nach UV-Bestrahlung bei Maus L-Zellen (Inkubationszeit 2 h)

— — — — Inkubationstemperatur 22° C

———— Inkubationstemperatur 37° C

Jede Kurve stellt die Medianwerte aus 1o Versuchen dar.

In der säureunlöslichen Fraktion der Maus L-Zellen (Abb.17) ist die Differenz zwischen den Einbauraten bei $22^{o}$ und $37^{o}$ C geringer als bei den kompletten Zellen (Abb. 16). Der Kurvenverlauf ist für beide Temperaturen abfallend, nur das Ausmaß des Thymidin-Einbaus ist unterschiedlich. Bei $22^{o}$ C werden 2o - 8o% mehr radioaktives Thymidin eingebaut als bei $37^{o}$ C.

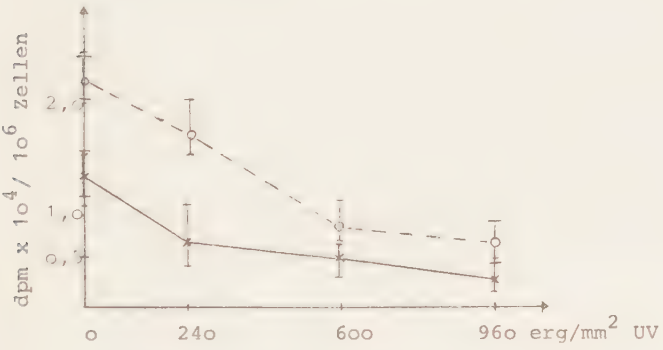



Abb. 17: Einfluß der Inkubationstemperatur auf den $^{3}H$-TDR-Einbau nach UV-Bestrahlung bei Maus L-Zellen (säureunlösliche Fraktion)
Inkubationszeit 2 h
Inkubationstemperatur $22^{o}$ C — — —
Inkubationstemperatur $37^{o}$ C ———

Der bei beiden Zellarten zu beobachtende gleichbleibende oder höhere Thymidin-Einbau bei $22^{o}$C durch die komplette Zelle steht vermutlich in Zusammenhang mit der durch das Liquid Holding verursachten Verzögerung des Zellteilungszyklus bei gleichzeitiger Begünstigung des Reparaturprozesses.

4. Wirkung von Coffein auf die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Da die bei den Maus L-Zellen festgestellte Steigerung des Thymidin-Einbaus auf einen Reparaturprozeß hinwies, wurden die Versuche zum $^{3}$H-TDR-Einbau mit coffeinhaltigem Medium wiederholt.

Die Zellen wurden in Petrischalen (Ø 4,5 cm) 46 Stunden in MEM bei 36° C inkubiert. Zwei Stunden vor der Bestrahlung wurde das Medium gewechselt und 2 mM Coffein zugesetzt. Die UV-Dosis betrug für beide Zellarten 24o-96o erg/mm$^2$. Nach der Bestrahlung (ohne Medium) erfolgte die Inkubation in 2 ml PBS bzw. isotonischer Kochsalzlösung mit 1 $\mu$Ci/ml $^{3}$H-TDR und 2 mM Coffein bei 22° oder 37°C für 2 Stunden.

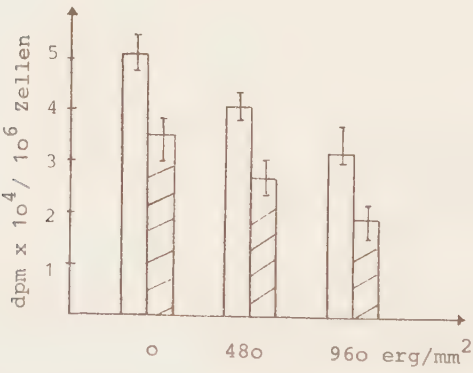



Abb. 18: Einfluß von Coffein auf den $^{3}$H-TDR-Einbau nach UV-Bestrahlung bei H.Ep.2-Zellen
Inkubationstemperatur 36°C (2 h)
weiße Säule - ohne Coffein
schraffierte Säule - mit 2 mM Coffein

Der $^{3}$H-TDR-Einbau durch H.Ep.2-Zellen bei Inkubation in Coffein-haltigem Medium ist in Abbildung 18 wiedergegeben. Allein durch die UV-Bestrahlung nehmen H.Ep.2-Zellen bei 36° C Inkubationstemperatur bis zu 35% weniger radioaktives Thymidin auf. Durch die Inkubation mit 2 mM Coffein tritt schon bei der unbestrahlten Kontrolle eine Hemmung des Thymidin-Einbaus auf. Bei höheren UV-Dosen wirkt sich der Einfluß des Coffeins noch stärker aus. Die Einbaurate sinkt auf etwa 4o% der der Aufnahme durch die unbestrahlte Kontrolle (ohne Coffein) ab.

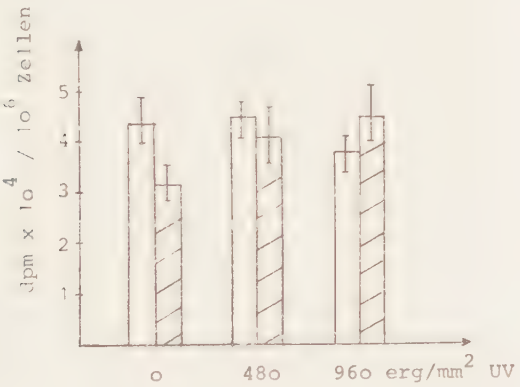



Abb. 19: Einfluß von Coffein auf den $^{3}$H-TDR-Einbau nach UV-Bestrahlung bei H.Ep.2-Zellen
Inkubationstemperatur 22° C
weiße Säule - ohne Coffein
schraffierte Säule - mit 2 mM Coffein
Jede Säule stellt den Medianwert aus 7 Versuchen dar.

Werden die H.Ep.2-Zellen dagegen bei 22° C mit 2 mM Coffein inkubiert, so steigt die die Thymidin-Einbaurate in Abhängigkeit von der UV-Dosis an (Abb.19). Ohne Coffein findet bei 22°C nur eine geringe Abnahme des $^{3}$H-TDR-Einbaus bei 96o erg/mm$^2$ UV statt.

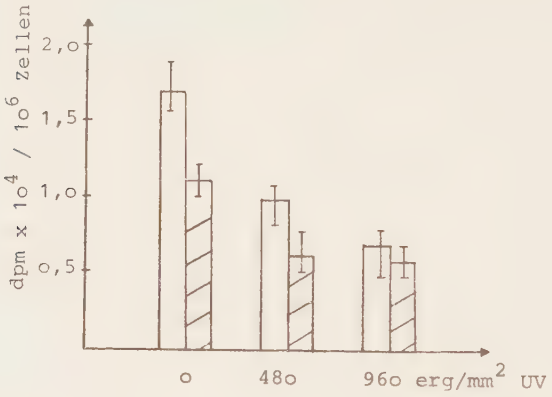



Abb. 2o: Einfluß von Coffein auf den $^{3}$H-TDR-Einbau nach UV-Bestrahlung bei H.Ep.2-Zellen (säureunlösliche Fraktion)
Inkubationstemperatur 36° C (2 h)
weiße Säule - ohne Coffein
schraffierte Säule - mit 2mM Coffein

Die Abbildungen 2o und 21 stellen den Umfang der Thydin-Aufnahme bei 22° und 36° C in die säureunlösliche Fraktion der H.Ep.2-Zellen dar. Bei beiden Inkubationstemperaturen wird der Einbau von radioaktivem Thymidin in die säureunlösliche Fraktion durch Coffein gehemmt. Der Einfluß des Coffeins ist bei 22° C geringer, z.T. nicht mehr signifikant nachweisbar. Die Hemmwirkung des Coffeins ist bei den unbestrahlten Kontrollen stärker zu erkennen als bei den bestrahlten Proben.

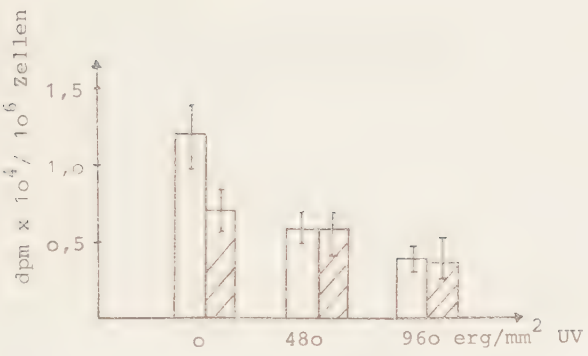



Abb. 21 : Einfluß von Coffein auf den $^3$H-TDR-Einbau nach UV-Bestrahlung bei H.Ep.2-Zellen (säureunlösliche Fraktion) Inkubationstemperatur 22° C (2 h) weiße Säule - ohne Coffein schraffierte Säule - mit 2 mM Coffein Jede Säule stellt den Medianwert aus 6 Versuchen dar.

In der gleichen Versuchsanordnung wurde der Einfluß von 2 mM Coffein auf den $^3$H-TDR-Einbau nach UV-Bestrahlung durch Maus L-Zellen geprüft.

Wie Abbildung 22 zeigt,wird bei Maus L-Zellen die $^3$H-TDR-Aufnahme bei 22° C durch 2 mM Coffein im Vergleich zur nicht mit Coffein behandelten Probe deutlich gehemmt. Dieser Effekt ist anscheinend auf eine besondere Coffein-Empfindlichkeit der außerplanmäßigen DNS-Synthese bei 22° C zurückzuführen. Die Reduzierung des Thymidin-Einbaus beträgt bis zu 30%. Im Gegensatz dazu wurde bei 36° C die Aufnahme von radioaktivem Thymidin durch Coffein nicht eindeutig

gehemmt. Bei einer relativ niedrigen UV-Dosis von 24o erg/mm$^2$ erfolgt stattdessen durch Coffein eine leichte Erhöhung des $^3$H-TDR-Einbaus.

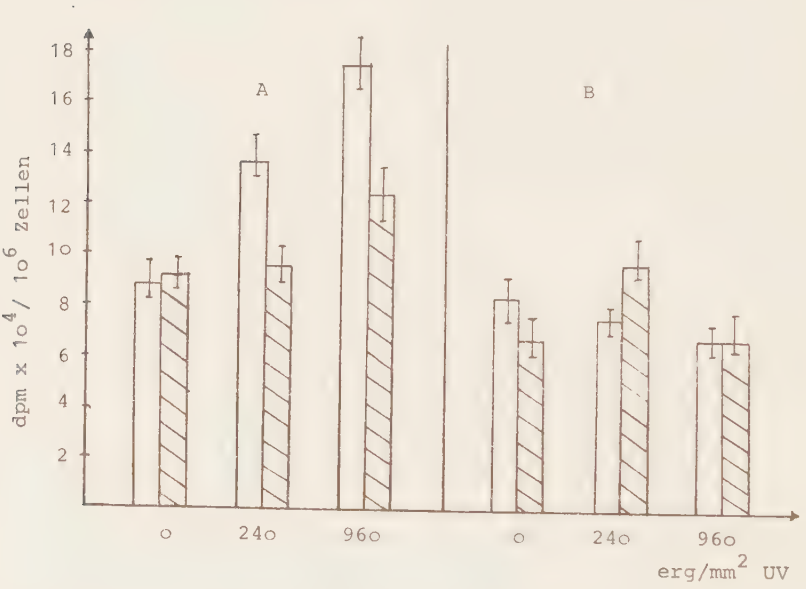



Abb. 22: Einfluß von Coffein auf die $^3$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung bei Maus L-Zellen
A - Inkubation bei 22$^o$ C (2 h)
B - Inkubation bei 36$^o$ C (2 h)
weiße Säule - ohne Coffein
schraffierte Säule - mit 2 mM Coffein
Jede Säule stellt den Medianwert aus 9 Versuchen dar.

Das Maximum der $^3$H-TDR-Aufnahme durch Maus L-Zellen bei 36$^o$ C nach Bestrahlung mit 24o erg/mm$^2$ UV trat bei insgesamt 7 Versuchen regelmäßig auf und ist als signifikant anzusehen.

Um das unterschiedliche Aufnahmeverhalten der Maus L-Zellen bei 22° und 36° C zu klären, wurde der $^{3}H$-TDR-Gehalt in der TCE-löslichen und TCE-unlöslichen Fraktion gemessen (Abb. 23 a-d). Es zeigte sich, daß die Einbauraten in die säureunlösliche Fraktion im gleichen Verhältnis zueinanderstehen wie die in die Gesamtzelle, und daß sie durch Coffein auch um den entsprechenden Prozentsatz reduziert werden. Die Thymidin-Aufnahme in die säureunlösliche Fraktion dagegen wird bei beiden Temperaturen nach der Bestrahlung durch Coffein nur gering oder gar nicht gehemmt.

(Der TCE-Extrakt wurde in allen Versuchen geprüft. Da, wie in dem oben erwähnten Fall, keine Abweichungen gegenüber der Gesamtzelle auftraten, wurden die Ergebnisse nicht mit aufgeführt.)

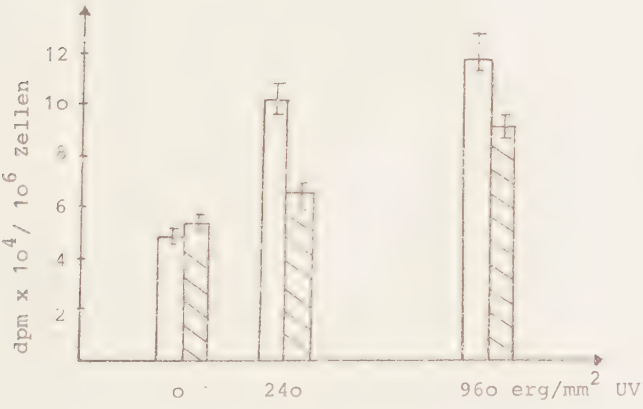



Abb. 23 a: TCE-Extrakt, Inkubationstemperatur 22° C

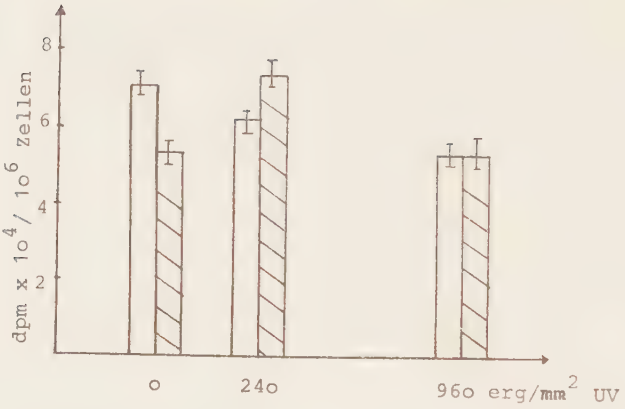



Abb. 23 b: TCE - Extrakt
Inkubationstemperatur 36° C

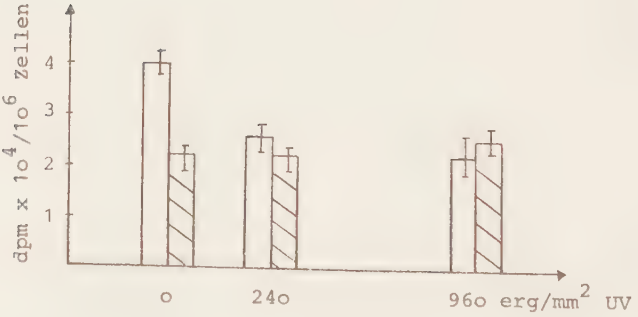



Abb. 23 c: säureunlösiche Fraktion
Inkubationstemperatur 22° C

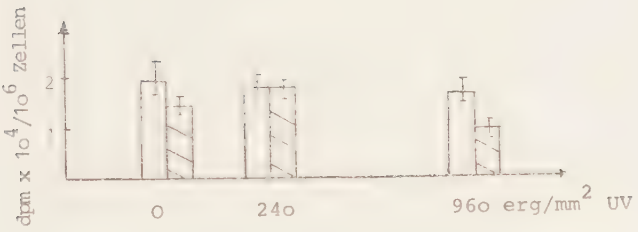



Abb. 23 d: säureunlösliche Fraktion
Inkubationstemperatur 36° C

Abb. 23 a-d: Einfluß von Coffein auf die $^3$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung in die säurelösliche und säureunlösliche Fraktion von Maus L-Zellen bei 22° und 36° C
Inkubationszeit 2 h
weiße Säule - ohne Coffein
schraffierte Säule - mit 2 mM Coffein

5. Wirkung von Oxyharnstoff auf die $^3$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Zur Untersuchung der Wirkungsbeeinflussung von UV-Strahlung durch Oxyharnstoff auf die $^3$H-TDR-Aufnahme in die Zellen wurde die gleiche Versuchsanordnung gewählt , wie zur Untersuchung der Hemmung durch Coffein.

Die Zellen wurden 46 Stunden in Glaspetrischalen (Ø 4,5 cm) gezüchtet und während der Inkubation mit 5% $CO_2$ in Luft begast. Zur Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt und anschließend durch PBS oder isotonische Kochsalzlösung mit den angegebenen Oxyharnstoff-Konzentrationen ersetzt und die Zellen für 2 Stunden bei $22^{o}$ oder $36^{o}$ C inkubiert. Bei den unbestrahlten Kontrollen wurde ebenfalls ein Mediumwechsel durchgeführt.

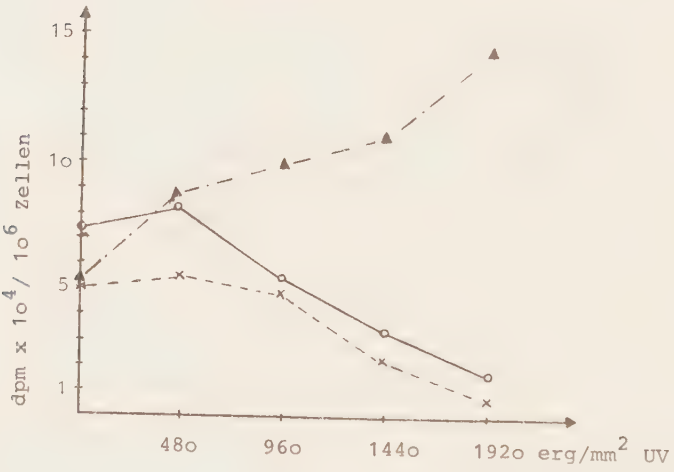



Abb. 24: Wirkung von Oxyharnstoff auf die $^3$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung durch H.Ep.2-Zellen
Inkubationstemperatur $22^{o}$ C (2 h)

— — — — ohne Oxyharnstoff
———— mit 2,5 mM Oxyharnstoff
—·—·— mit 4 mM Oxyharnstoff

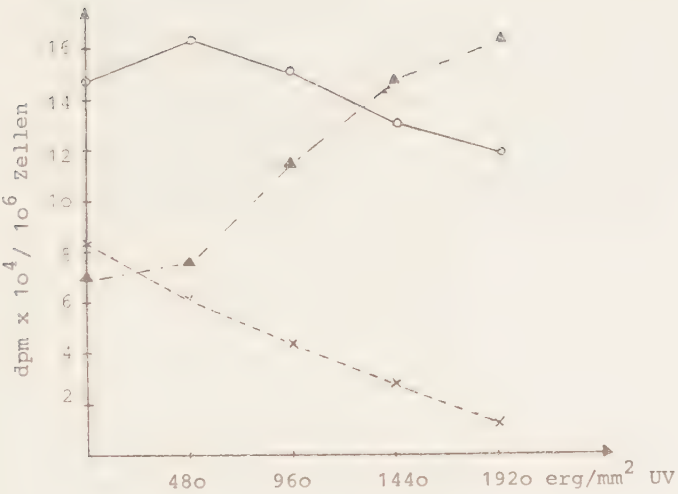



Abb. 25: Einfluß von Oxyharnstoff auf die $^3$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung durch H.Ep.2-Zellen
Inkubationstemperatur 36$^o$ C (2 h)
— — — — ohne Oxyharnstoff
———— mit 2,5 mM Oxyharnstoff
— . — . — mit 4 mM Oxyharnstoff

Wie die Abbildungen 24 und 25 zeigen, erfolgt bei H.Ep.2-Zellen durch Oxyharnstoff nicht die erwartete Hemmung des $^3$H-TDR-Einbaus. In einer Konzentration von 2,5 mM bewirkt HU im Vergleich zur Kontrolle eine größere Aufnahme an radioaktivem Thymidin. Die Aufnahmesteigerung ist temperaturabhängig und tritt besonders bei höheren Strahlendosen auf. Bei 22$^o$ C erfolgt z.B. bei 192o erg/ mm$^2$ eine Steigerung um ca. 1oo%, bei 48o erg/mm$^2$ um ca. 6o%. Bei

$36^{o}$ C ist die Erhöhung der Thymidin-Aufnahme wesentlich größer als bei $22^{o}$ C (1oo - 7oo%). Die Inkubation mit 4 mM HU unmittelbar nach der Bestrahlung bewirkt ebenfalls bei beiden Inkubationstemperaturen eine Erhöhung des $^{3}$H-TDR-Einbaus. Die Thymidin-Aufnahme der unbestrahlten Zellen bei $36^{o}$ C ist dagegen bei dieser hohen Oxyharnstoff-Konzentration geringer als bei der Kontrolle und als bei 2,5 mM HU.

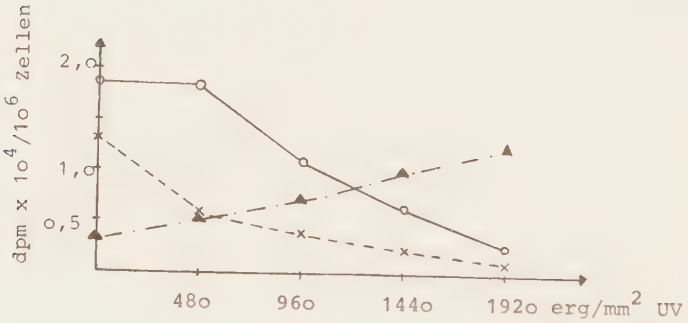



Abb. 26: Einfluß von Oxyharnstoff auf den $^{3}$H-TDR-Einbau in die säureunlösliche Fraktion UV-bestrahlter H.Ep.2-Zellen
Inkubationstemperatur $22^{o}$ C (2 h)
– – – – – ohne Oxyharnstoff
——————— mit 2,5 mM Oxyharnstoff
—·—·— mit 4 mM Oxyharnstoff

Die Abbildung 26 und 27 geben die Wirkung von Oxyharnstoff auf den Thymidin-Einbau in die säureunlösliche Fraktion von H.Ep.2-Zellen wieder. Bei $22^{o}$ C wird in Gegenwart von 2,5 mM HU mehr Thymidin in die hochpolymere Fraktion eingebaut als bei der HU-freien Kontrolle.

Mit steigender Strahlendosis wird der Unterschied geringer. Ohne UV-Einwirkung verursacht ein Zusatz von 4 mM HU zum Inkubationsmedium eine starke Hemmung der Thymidin-Aufnahme in die säureunlösliche Fraktion. Proportional zur UV-Dosis erfolgt bei der Inkubation mit 4 mM Oxyharnstoff eine Erhöhung des $^{3}$H-TDR-Einbaus, während die HU-freie Kontrolle durch die UV-Strahlen stark gehemmt wird.

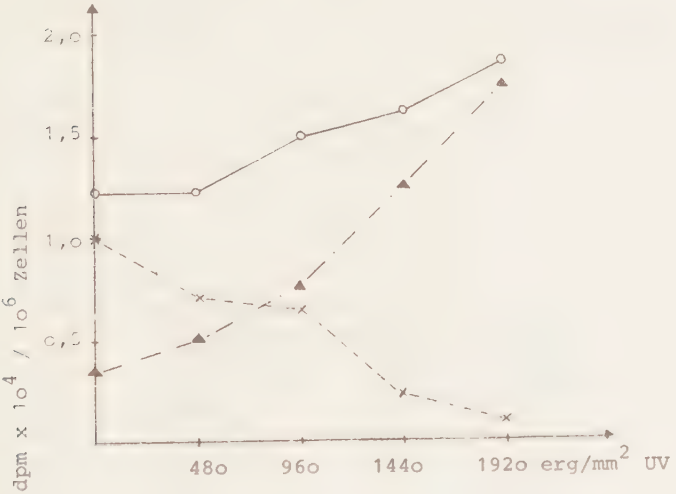



Abb. 27: Einfluß von Oxyharnstoff auf den $^{3}$H-TDR-Einbau in die säureunlösliche Fraktion UV-bestrahlter H.Ep.2-Zellen
Inkubationstemperatur 36° C (2 h)
– – – – ohne Oxyharnstoff
——— mit 2,5 mM Oxyharnstoff
—.—.— mit 4 mM Oxyharnstoff

Bei 36° C scheint die Steigerung der Thymidin-Aufnahme in die DNS durch 2,5 mM Oxyharnstoff optimal zu sein. Dagegen macht sich bei einer HU-Konzentration von 4 mM HU ohne UV-Bestrahlung und auch bei niedrigen UV-Dosen im Vergleich zur Inhibitor-freien Kontrolle eine Hemmwirkung bemerkbar. Ab 960 erg/mm$^2$ UV ist die Einbaurate auch in Gegenwart von 4 mM HU größer als bei der Kontrolle.

Die gleichen Versuche wurden mit Maus L-Zellen durchgeführt. Es wurde dieselbe Versuchsanordnung wie für H.Ep.2-Zellen beibehalten, aber auf Grund der etwas größeren Strahlenempfindlichkeit der Maus L-Zellen wurden nur UV-Dosen bis 960 erg/mm$^2$ benutzt.

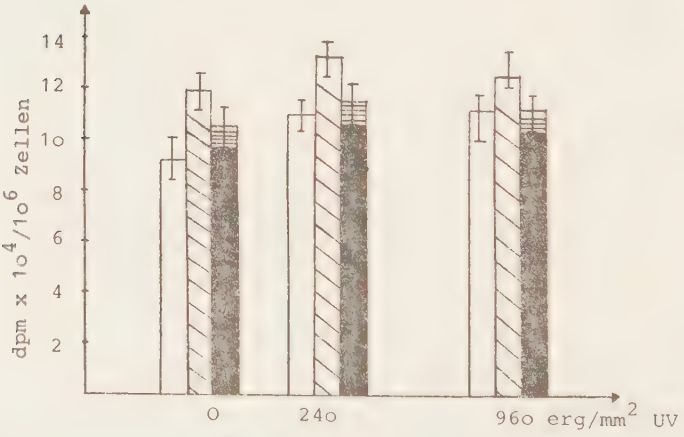



Abb. 28a: Maus L -Zellen
Inkubationstemperatur 22° C (2 h)

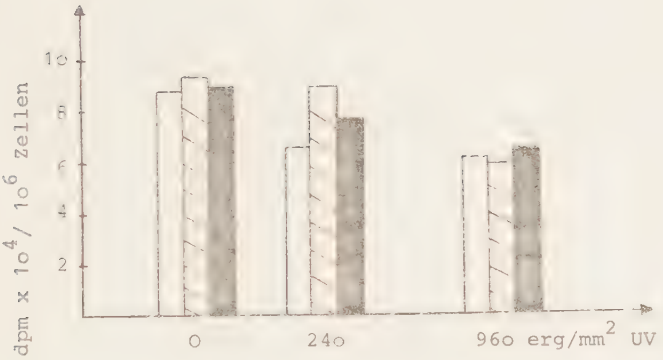



Abb. 28b: Maus L-Zellen
Inkubationstemperatur 36°C (2 h)

Abb. 28a/b: Einfluß von Oxyharnstoff auf die $^3$H-TDR-Aufnahme UV-bestrahlter Maus L-Zellen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen
weiße Säule - ohne HU
schraffierte Säule - mit 2,5 mM HU
schwarze Säule - mit 4 mM HU

Wie die Abbildungen 28a/b wiedergeben, bewirkt Oxyharnstoff bei UV-bestrahlten Maus L-Zellen sowohl bei 22° als auch bei 36° C nur eine leichte Erhöhung des Thymidin-Einbaus. Die Steigerung ist bei 2,5 mM HU größer als bei 4 mM oder gar nicht zu erkennen.

Die Aufnahme von radioaktivem Thymidin in die säureunlösliche Fraktion von Maus L-Zellen in Gegenwart von Oxyharnstoff stellen die Abbildungen 29 a/b dar.

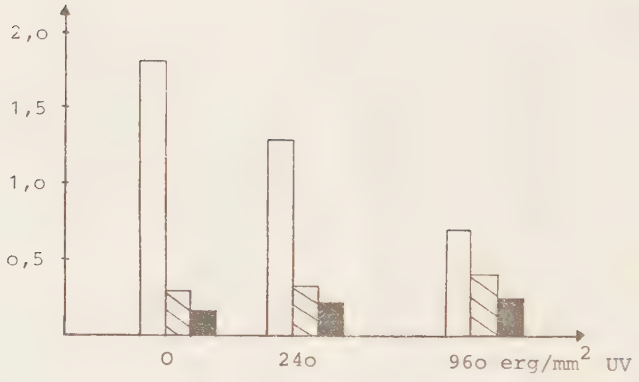



Abb. 29a: Inkubationstemperatur 22°C ( 2h)

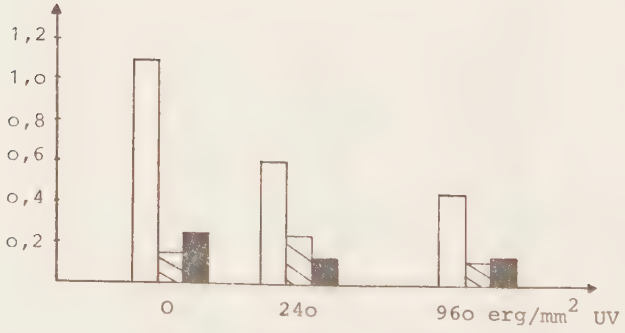



Abb. 29b: Inkubationstemperatur 36°C (2 h)

Abb. 29 a/b: Einfluß von Oxyharnstoff auf den $^{3}$H-TDR-Einbau in die säureunlösliche Fraktion UV-bestrahlter Maus L-Zellen
weiße Säule - ohne HU
schraffierte Säule - mit 2,5 mM HU
schwarze Säule - mit 4 mM HU

Wie aus den graphischen Darstellungen zu ersehen ist, erfolgt durch die Inkubation mit 2,5 mM Oxyharnstoff bei beiden Temperaturen eine starke Hemmung des absoluten $^{3}$H-TDR-Einbaus. Durch die höhere Konzentration von 4 mM HU wird die semikonservative Replikation bei beiden Temperaturen nicht stärker gehemmt. Mit steigender UV-Dosis ist bei 22$^{o}$ C für 2,5 mM HU eine geringere Hemmwirkung zu beobachten.

## 6. Statistische Prüfung der Ergebnisse

Zur Überprüfung, ob den Ergebnissen eine statistische Signifikanz zugesprochen werden kann, wurde der Wilcoxon-Test für 2 Stichproben aus stetigen Verteilungen angewandt (1o1).

Hierbei werden die ermittelten Stichproben mit den Medianwerten $\mu_1$ und $\mu_2$ zu einem Kollektiv mit dem Umfang n vereinigt. Allen Meßwerten werden Ränge von 1-n zugeteilt, wobei dem niedrigsten der Rang 1, dem zweitniedrigsten der Rang 2 usw. zugeordnet wird. Die Ränge der $x_1$-Werte werden addiert und bilden die Summe $T_1$. Mit Hilfe von Tabellen wird überprüft, ob $T_1$ die Signifikanzschranken überschreitet. Erreicht $T_1$ die Signifikanzschranken oder überschreitet sie nach außen, so gilt

$$\mu_1 \neq \mu_2 \text{ , wenn } T_1 \leq T_L \text{ oder } T_1 \geq T_R$$

Die Anwendung des Wilcoxon-Testes soll anhand der Signifikanzprüfung für die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung durch Maus L-Zellen bei 22$^{o}$C demonstriert werden.

Tabelle 1: $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach UV-Bestrahlung durch Maus L-Zellen innerhalb von 2 h bei 22° C
Stichprobe 1: TDR-Aufnahme ohne UV-Bestrahlung
Stichprobe 2: TDR-Aufnahme nach 6oo erg/mm$^2$

| Stichprobe 1 (dpm x 1o$^4$ pro 1o$^6$ Zellen) | Rang | Stichprobe 2 (dpm x 1o$^4$ pro 1o$^6$ Zellen) | Rang |
|---|---|---|---|
| 12,5 | 2 | 19,2 | 11 |
| 15,8 | 7 | 2o,2 | 13 |
| 2o,o | 12 | 18,9 | 1o |
| 13,8 | 5 | 21,o | 15 |
| 13,1 | 3 | 2o,5 | 14 |
| 14,o | 6 | 16,2 | 8 |
| 13,2 | 4 | | |
| 17,5 | 9 | | |
| 1o,7 | 1 | | |
| | $\sum$ = 49 = $T_1$ | | |
| $n_1$ = 9 | | $n_2$ = 6 | |

Für $n_1$=9 und $n_2$ = 6 ist $T_L$ = 55 laut Tabelle für die Signifikanz. Da $T_1$ = 48 < $T_L$ = 55 ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von mehr als 95%, daß die erzielte Aufnahmesteigerung nach 6oo erg/mm$^2$ UV bei einer Inkubationstemperatur von 22° C signifikant ist.

In der gleichen Weise wurden die Ergebnisse der anderen Versuche auf ihre Signifikanz geprüft.

Für die graphischen Darstellungen wurde aus den Rangfolgen der Medianwert ermittelt. Ist der Stichprobenumfang n

eine ungerade Zahl, so entspricht der Stichprobenwert in der Mitte der Rangfolge dem Medianwert. Ist n gerade, so stehen in der genannten Anordnung zwei Stichprobenwerte am weitesten in der Mitte. Es wird dann deren arithmetisches Mittel als Medianwert bezeichnet.

Die Maximum- und Minimumwerte jeder Stichprobe werden in den graphischen Darstellungen durch "Balken" angegeben. Wenn die Anzahl der Abszissenwerte kleiner als vier war, wurden in den graphischen Darstellungen statt Kurven Säulen verwandt.

# E. DISKUSSION

## 1. Aufnahme von Coffein-$^{14}$C nach UV-Bestrahlung

Voraussetzung für die Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Coffein ist eine ausreichend hohe Coffein$^{+}$-Aufnahme durch die Zellen. Nur dann wäre es möglich, mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation und Radioaktivitätsmessungen Untersuchungen zur Ermittlung des Angriffspunktes von Coffein in der Zelle durchzuführen.

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß nur sehr wenig Coffein$^{*}$ von der Zelle aufgenommen wird. Bei einer Konzentration von 2 mM Coffein$^{*}$ ließen sich in Maus L-Zellen 46 dpm/1o$^{6}$ Zellen messen und bei H.Ep.2-Zellen nur maximal 27 dpm/ 1o$^{6}$ Zellen (Abb. 6+7). Die Bestrahlung mit UV-Licht bewirkte eine geringe Erhöhung der Aufnahme. Die größte Einbaurate ( 82 bzw. 41 dpm/1o$^{6}$ Zellen) ließ sich bei beiden Stämmen mit der niedrigsten Coffein$^{*}$-Konzentration nach UV-Bestrahlung erzielen, bei der auch die geringste Hemmung des Zellwachstums auftrat.

Ts'O (83) hatte in vitro eine Bindung von Coffein an denaturierte Einzelstrang-DNS beobachtet, aber nicht an Doppelstrang-DNS. Domon (26) stellte fest, daß Coffein im Gegensatz zu anderen Stoffen eine besonders hohe Affinität zu einer DNS hat, die teilweise durch UV-Be - strahlung denaturiert ist.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß Coffein

mit den durch die UV-Bestrahlung erzeugten kurzen Einzelstrangregionen reagiert. Geht man von einem Bakterienmodell aus, so gibt es zwei Möglichkeiten für die Anlagerung von Coffein an die teilweise denaturierte DNS. Entweder verbindet sich Coffein mit den Strangenden an den Strangbrüchen, oder es lagert sich in dem Strangbruch an die intakte DNS an. Da mit steigender UV-Dosis mehr Pyrimidin-Dimere und damit auch mehr Strangbrüche erzeugt werden, müßte die Einbaurate an Coffein* proportional steigen. Die Untersuchungen über die Coffein-Aufnahme zeigten jedoch ein Maximum des Einbaus bei einer geringen UV-Dosis (72 erg/mm$^2$; Abb. 8+9).

Die entscheidende Barriere für das Eindringen von Coffein in die Zelle wird durch die Zellmembran gebildet. In einer Untersuchung über den Einbau von Purinen in Hefen wurde festgestellt, daß das Transportsystem für die Aufnahme von Purinbasen sehr spezifisch ist (1o2). Veränderungen am oder im Purinringsystem bewirken, daß die entsprechende Verbindung nicht mehr erkannt wird. Sollten die Zellen über ein ähnliches Transportsystem verfügen, würde Coffein auf Grund seiner Liganden von ihm nicht akzeptiert werden.

Bei einer passiven Permeation des Coffeins in die Zelle bestünde eine lineare Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von der Differenz zwischen Außen- und Innenkonzentration des Permeanden. Die Versuche zur Coffein*-Aufnahme während der Inkubation mit unterschiedlichen Coffein-Konzentrationen, ergaben ein Maximum des Einbaus bei der geringsten Coffein*-Konzentration (Abb. 1o).

Es ist möglich, daß Coffein seinen Einfluß auf die Reparaturvorgänge in der Zelle durch eine Membranwechselwirkung ausübt, so daß kein Einbau in die Zellen erforderlich ist.

2. DNS-Abbau nach UV-Bestrahlung

Setlow (77) hatte nachgewiesen, daß Pyrimidin-Photoprodukte die wesentliche Ursache für die letale Wirkung der UV-Strahlung bei Bakterien darstellt.

Welche Bedeutung die Pyrimidin-Photoprodukte bei Säugetierzellen haben, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, da bei der Eliminierung von Thymin-Dimeren Unterschiede zwischen Nagetierzellen und menschlichen Zellen auftreten. Nagetierzellen (Maus L, chinesische Hamsterzellen) sind im Gegensatz zu menschlichen Zellen (H.Ep.2, HeLa) nicht in der Lage Dimere zu eliminieren (17, 65, 85), aber sie zeigen auch eine de novo DNS-Synthese.

In der vorliegenden Arbeit wurde die $^{3}$H-TDR-Abgabe nach UV-Bestrahlung in vergleichenden Untersuchungen bei Maus L- und H.Ep.2-Zellen geprüft.

Bei H.Ep.2-Zellen konnte nach der UV-Bestrahlung im Inkubationsmedium ein erhöhter $^{3}$H-TDR-Gehalt festgestellt werden (Abb. 11). Die Thymidin-Abgabe war abhängig von der UV-Dosis. Zwischen den UV-Dosen 480 und 960 erg/mm$^2$ ließ sich nur ein geringer Unterschied erkennen. Die Abgabe von $^{3}$H-TDR könnte mit einer Eliminierung von TT einhergehen.

Cleaver und Trosko (17) diskutierten die Möglichkeit, daß der DNS-Abbau durch das Absterben bestrahlter Zellen und eine dadurch bedingte Lysis hervorgerufen wird.Folgende Ergebnisse sprechen jedoch dafür, daß es sich bei dem innerhalb der ersten drei Stunden nachgewiesenen

DNS-Abbau um das selektive Herausschneiden von DNS-Regionen mit UV-Photoprodukten handelt:

1. In UV-bestrahlten Zellen findet innerhalb der ersten drei Stunden nach der Bestrahlung ein stärkerer DNS-Abbau statt als in unbestrahlten Zellen.Das Ausmaß des DNS-Abbaus nimmt, wie Landeck (48) feststellte, innerhalb der ersten 24 Stunden nur geringfügig zu. Das spricht gegen eine spontane Lysis.
2. Es wurden die gemessenen Impulse / $10^6$ Zellen ausgewertet. Die erforderliche Zellzählung zeigte im mikroskopischen Präparat keine Anzeichen einer Zelllyse.
3. Eine Kontrolluntersuchung der säureunlöslichen Fraktion ergab eine Bestätigung für die Excision von Dimeren (Abb. 12). Durch UV-Bestrahlung erfolgte eine Verringerung des $^3$H-TDR-Gehaltes der hochpolymeren Fraktion. Die Abnahme war UV-dosisabhängig. Bei 960 erg/mm$^2$ UV erreichte die Eliminierungsrate der Pyrimidin-Dimeren 36%.

Die aufgezeigten Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Coyle und Strauss (19), die die Dimeren-Eliminierung bei isolierter DNS von H.Ep.2-Zellen mit Hilfe einer für Pyrimidin-Dimere spezifischen Endonuclease aus M.lysodeicticus nachwiesen.

Im Gegensatz zu den H.Ep.2-Zellen zeigten Maus L-Zellen keine signifikante Abgabe von radioaktivem Thymidin an das Inkubationsmedium. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen von Klimek und Vlasinova (45).

## 3. Reparaturprozesse nach UV-Bestrahlung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Die Bestrahlung von Säugetierzellen mit UV-Licht induziert einen außergewöhnlichen Einbau von $^{3}$H-TDR in die DNS (6o,61). Abweichend von der der normalen DNS-Replikation tritt diese strahlungsinduzierte $^{3}$H-TDR-Aufnahme in Zellen auf, die nicht in der DNS-Synthesephase sind. Die Synthese ist nicht semikonservativ. Der Charakter dieses Strahlungseffektes ist unbekannt, aber die vorhandenen Ergenisse werden als Hinweis auf einen Reparaturprozeß gedeutet (18,31,6o,66), analog dem Reparaturprozeß in bakteriellen Systemen.

Bisher wurde dieses Phänomen meistens bei 36$^{o}$C bei in Nährmedien kultivierten Zellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis für die außerplanmäßige DNS-Synthese der bestrahlten Zellen durch Bestimmung des $^{3}$H-TDR-Einbaus angestrebt, der während der Inkubation bei 22$^{o}$ oder 36$^{o}$ C in Salzlösungen (LH) nach der Bestrahlung erfolgte. Die Reparaturprozesse wurden auch bei 22$^{o}$ C untersucht, um festzustellen, ob der Liquid Holding Effekt durch die erniedrigte Inkubationstemperatur gefördert wird. Werden nach einer UV-Schädigung Zellen unter LH-Bedingungen kultiviert, so können zwei entgegengesetzte Effekte auftreten:

a. LHR - liquid holding recovery, das durch eine ansteigende Kolonieformfähigkeit nach der Bestrahlung gekennzeichnet ist,
b. NLHE - negative liquid holding effect, die Überlebensrate nach UV-Bestrahlung nimmt als Folge des LH ab (1o3).

Für die durchgeführten Versuche ist nur a. von Interesse.

Um festzustellen, innerhalb welcher Zeit die bestrahlten Zellen unter LH-Bedingungen die Reparatur der Strahlenschäden durchführen, wurde die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach verschiedenen Inkubationszeiten geprüft. Cleaver (18) hatte beobachtet, daß bei chinesischen Hamsterzellen die Reparatur-Replikation innerhalb von 4 Stunden zu 5o% vollzogen ist. Die Versuche mit Maus L- und H.Ep.2-Zellen zeigen, daß bei 22$^{o}$C die $^{3}$H-TDR-Aufnahme nach zwei Stunden ein Maximum aufweist. Demnach ist zu diesem Zeitpunkt schon ein wesentlicher Teil der Reparatur durchgeführt worden. Wahrscheinlich läuft die Reparatur-Replikation unter diesen energiearmen Bedingungen (Puffer,22$^{o}$C) gegenüber der semikonservativen Replikation bevorzugt ab.

Die Untersuchungen zur Thymidin-Aufnahme nach unterschiedlichen UV-Dosen zeigen für Maus L-Zellen erhebliche Unterschiede zwischen den Einbauraten bei 22$^{o}$ und 36$^{o}$ C (s.Abb. 16). Bei einer Inkubationstemperatur von 22$^{o}$ C nimmt der Thymidin-Einbau nach einer Bestrahlung mit 6oo erg/mm$^{2}$ um ca. 45% zu, während die gleiche UV-Dosis bei 36$^{o}$C eine Abnahme des Einbaus im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle um ca. 28% bewirkt.

Da alle Versuche unter LH-Bedingungen (NaCl- bzw. PBS-Lösung) durchgeführt wurden, ist anzunehmen, daß die Inkubation in Salzlösung allein nicht ausreicht, um den Zellzyklus so zu verzögern, daß die Reparatur-Replikation bevorzugt ablaufen kann, bevor der Strahlenschaden durch die semikonservative Replikation manifestiert wird. Erst das LH bei 22$^{o}$ C erlaubt eine erhöhte Thymidin-Aufnahme durch die Hemmung des Zellzyklus.

Eine zusätzliche Begünstigung der Reparatur-Replikation könnte durch eine Hemmung der Proteinsynthese auftreten. Epstein (29) hatte 197o beobachtet, daß in der Epidermis von Mäusen innerhalb der ersten Stunden nach der Bestrahlung mit UV-Licht eine Verminderung der Proteinsynthese erfolgt.

Bei den Maus L-Zellen wird die Beeinträchtigung der Proteinsynthese durch die UV-Bestrahlung wahrscheinlich durch das Liquid Holding und vor allem durch die erniedrigte Inkubationstemperatur verstärkt.

Gautschi und Cleaver (33) stellten durch Untersuchungen an UV-bestrahlten HeLa- und CHO-Zellen fest, daß eine Hemmung der Proteinsynthese die semikonservative Replikation rapide reduziert, während die Reparatur-Replikation nicht beeinflußt wird. Wenn die Reparatur-Replikation in Abwesenheit der Proteinsynthese auftreten kann, so ist die größte Überlebensrate der Zellen nach UV-Bestrahlung dann zu erwarten, wenn einige Zellen, die vor der Bestrahlung in die S-Phase eingetreten waren, ihre normale DNS-Repliaktion beenden können und kein neuer Zellzyklus angefangen wird. Dadurch würden die Reparatursynthesen begünstigt werden.

Diese Ergebnisse und Überlegungen könnten erklären, warum bei Maus L-Zellen die Reparatur-Replikation bei 22$^{o}$C in größerem Umfang abläuft als bei 36$^{o}$ C.

Die Versuche mit H.Ep.2-Zellen unter den gleichen Bedingungen ergeben geringere Unterschiede im Thymidin-Einbau für die beiden Inkubationstemperaturen. Bis zu einer UV-Dosis von 96o erg/mm$^{2}$ wird bei 36$^{o}$ C mehr Thymidin eingebaut als bei 22$^{o}$ C. Im Gegensatz zu den Maus L-Zellen erfolgt allein durch die erniedrigte Inkubationstemperatur eine Verminderung des $^{3}$H-TDR-Einbaus.

Vermutlich sind H.Ep.2-Zellen temperaturempfindlicher als Maus L-Zellen, so daß bei 22° C im LH die semikonservative Replikation stärker beeinträchtigt wird. Da der Umfang der Thymidin-Aufnahme bei 22° C bis 960 erg/$mm^2$ gleichbleibend ist, während er bei 36° C mit steigender UV-Dosis abnimmt, ist anzunehmen, daß die Reparatur-Replikation auch bei H.Ep.2-Zellen durch eine erniedrigte Inkubationstemperatur beim LH gefördert wird.

Die Unterschiede zwischen Maus L- und H.Ep.2-Zellen lassen sich vielleicht durch die verschiedenen Reparatursysteme der beiden Zellarten erklären. Wie in den Untersuchungen zum DNS-Abbau festgestellt wurde, sind H.Ep.2-Zellen in der Lage eine Excisionsreparatur durchzuführen (s.Abb. 12), während Maus L-Zellen keine Dimere an das Inkubationsmedium abgeben können (s.Abb. 11). Vermutlich haben Maus L-Zellen die Fähigkeit, die UV-induzierten Photoprodukte in der Eltern-DNS bei der nachfolgenden DNS-Synthese zu umgehen ( 63 ). Durch das LH bei 22° C wird dieser "bypass" möglicherweise unterstützt.

Der starke Abfall der Kurven für die Thymidin-Aufnahme nach einer Bestrahlung (600 erg/$mm^2$) als auch bei H.Ep.2-Zellen (960 erg/$mm^2$) beruht vielleicht auf einer Inaktivierung der Reparatursysteme durch die Bestrahlung. Wenn die Anzahl der UV-Schäden in den DNS-Strängen ein bestimmtes Maß überschreitet, ist auch kein "bypass" und keine Reparatur-Replikation mehr möglich.

4. Einfluß von Coffein auf die Reparatur-Replikation

Die verschiedenen Thymidin-Einbauraten während einer Inkubation mit Coffein nach UV-Bestrahlung weisen auch

auf die unterschiedlichen Reparatursysteme bei menschlichen Zellen und Nagetierzellen hin.

Bei Maus L-Zellen bewirkt die Inkubation mit 2 mM Coffein bei 22° C eine Verringerung der Thymidin-Aufnahme. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Rauth (63) überein, der bei Maus L-Zellen eine erhöhte UV-Empfindlichkeit beobachtete, wenn die Zellen nach der UV-Bestrahlung mit Coffein inkubiert wurden. Werden Maus L-Zellen dagegen bei 36 ° C inkubiert, so läßt sich keine Hemmung der Reparatur-Replikation durch Coffein feststellen,da trotz LH bei dieser Inkubationstemperatur eine semikonservative Replikation abläuft, die durch Coffein nicht beeinflußt wird. Nach Painter (1o4) beträgt der totale Umfang der Reparatursynthese weniger als 1% der semikonservativen Replikation.

Im Gegensatz zu den Maus L-Zellen wird die Reparatursynthese bei H.Ep.2-Zellen bei 22° C nicht durch Coffein gehemmt. Es zeigt sich sogar ein leicht stimulierender Effekt des Coffeins, der auch von Kuhlmann (47) bei HeLa-Zellen beobachtet wurde. Coffein ist also bei H.Ep.2-Zellen ebenso wie bei anderen menschlichen Zellen (47,97) nicht in der Lage, die Excisionsreparatur zu beeinträchtigen.

Die Reduzierung der Thymidin-Einbaurate in H.Ep.2-Zellen bei 36° C durch 2 mM Coffein läßt sich vermutlich auf die toxische Wirkung des Coffeins in dieser Konzentration zurückführen, da die Hemmung der Thymidin-Aufnahme auch bei den unbestrahlten Zellen auftritt.

5. Einfluß von Oxyharnstoff auf die Reparatur-Replikation

Oxyharnstoff unterdrückt in unbestrahlten Zellen weitgehend die semikonservative DNS-Synthese (2o, 59,78,1oo), während in UV-bestrahlten Zellen die außerplanmäßige DNS-Synthese nicht gehemmt wird (3,15). Ein Grund für die ungehemmt ablaufende Reapratursynthese in Gegenwart von 2,5 mM HU könnte die geringe Menge an $^{3}$H-TDR sein, die für die Reparatur-Replikation erforderlich ist. Die Hemmung der Ribonucleosid-Diphosphat-Reduktase ist bei einer Konzentration von 2,5 mM HU nicht vollständig, so daß noch einige Nukleotide synthetisiert werden können.

Außerdem kommt es in Anwesenheit von 2,5 mM HU zu einer Anhäufung von neu synthetisierter DNS mit Einzelstrangbrüchen (2o). Für die Anhäufung der Strangbrüche gibt es zwei Hypothesen:

1. Die DNS wird in kleine Fragmenten synthetisiert, die sich in Gegenwart von HU nicht zu einer Einheit verbinden können.
2. Strangbrüche, die immer in neu synthetisierter "langer" DNS auftreten, werden in Anwesenheit von HU nicht repariert.

Durch die Inkubation mit 2,5 mM HU bei 22$^{o}$ C wird die semikonservative Replikation von H.Ep.2-Zellen teilweise unterdrückt. Da das LH bei 22$^{o}$ C den gleichen Effekt einer Herabsetzung der DNS-Synthese hat, lassen sich zwischen den Thymidin-Einbauraten der Zellen, die mit oder ohne 2,5 mM HU inkubiert wurden, keine wesentlichen Unterschiede erkennen.

In Gegenwart von 4 mM HU wird bei 22$^{o}$C die Aufnahme an

$^3$H-TDR proportional zur UV-Dosis gesteigert (s.Abb.24). Vermutlich kommt es bei dieser hohen HU-Konzentration zu einer größeren Anhäufung von Strangbrüchen, für deren Reparatur ein vermehrter Thymidin-Einbau erforderlich ist.

Eine Erhöhung der Einbaurate von radioaktivem Thymidin durch die Inkubation mit HU konnte Neuhard (54) auch bei E. coli beobachten.

Bei 36$^{o}$ C ist der Einbau von $^3$H-TDR bei der Inkubation mit 2,5 mM HU zunächst größer als in Gegenwart von 4 mM Oxyharnstoff. Smets (79) fand bei menschlichen T-Zellen, daß mit steigender UV-Dosis der Reparatur-Einbau von Pyrimidin-Desoxynucleotiden in allen Phasen des Zellzyklus durch die kombinierte Wirkung von HU und UV-Licht erhöht wird, wogegen die normale DNS-Synthese gehemmt wird.

Während der Reparatursynthese in Anwesenheit von Oxyharnstoff können die Zellen $^3$H-TDR aus dem Inkubationsmedium aufnehmen, das aber allein noch keine DNS-Replikation zuläßt, weil die anderen drei Nukleotide fehlen.

Der erhöhte Thymidin-Gehalt der säureunlöslichen Fraktion von H.Ep.2-Zellen, die nach der Bestrahlung mit HU inkubiert wurden, zeigt, daß es sich nicht um einen unspezifischen Einbau von $^3$H-TDR zur Auffüllung des Nukleotid-Pools handelt (s.Abb.26/27). Das von den Zellen aufgenommene Thymidin wird offensichtlich für die Reparatur-Replikation verwandt.

Erstaunlich ist die reproduzierbare Steigerung der Thymidin-Aufnahme durch 4 mM HU selbst bei sehr hohen UV-Dosen (1920 erg/mm$^2$), bei denen das Maximum der Reparatur -Replikation ohne HU weit überschritten ist.

Da der vermehrte Einbau von $^{3}$H-TDR auf einem Zusammenwirken von HU und UV-Licht beruht und in diesem Maße nicht von einer Komponente allein verursacht werden kann, ist möglicherweise auch das Verhältnis zwischen HU-Konzentration und dem Umfang des Strahlenschadens von Bedeutung. Dies könnte das unterschiedliche Verhalten der Zellen bei 36$^{o}$ C gegenüber den beiden angewandten HU-Konzentrationen erklären. Bei niedrigen UV-Dosen genügen 2,5 mM Oxyharnstoff für eine Erhöhung des Thymidin-Einbaus, wogegen bei höheren UV-Dosen 4 mM HU erforderlich sind (Abb. 25).

Maus L-Zellen zeigen gegenüber Oxyharnstoff nach Bestrahlung mit UV-Licht ein ähnliches Verhalten wie H.Ep.2-Zellen, nur das Ausmaß der Aufnahmesteigerung ist geringer (Abb. 28). Außerdem ist in Gegenwart von HU innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Bestrahlung der Thymidin-Einbau in die säureunlösliche Fraktion stark gehemmt (Abb.29). Diese Hemmung wird mit steigender UV-Dosis geringer.

Da auch die unbestrahlten Zellen in Gegenwart von HU weniger Thymidin einbauen, ist anzunehmen, daß die angewandten HU-Konzentrationen für Maus L-Zellen toxisch sind, d.h. zu einer vollständigen Hemmung der DNS-Biosynthese führen.

## F. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reparaturmechanismen nach UV-Bestrahlung von H.Ep.2- und Maus L-Zellen untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. In UV-bestrahlten Maus L-Zellen wurde mit Hilfe des $^{3}$H-TDR-Einbaus eine Steigerung der Reparatur-Replikation unter LH-Bedingungen bei 22$^{o}$C gegenüber 36$^{o}$ C nachgewiesen.
   Die Signifikanz wurde durch den Wilcoxon-Test für zwei Stichproben gesichert (1o1).
2. Bei H.Ep.2-Zellen wurde durch die Inkubation bei 22$^{o}$C nach UV-Bestrahlung ebenfalls die außerplanmäßige DNS-Synthese gefördert, wenn auch in wesentlich geringerem Maße als bei Maus L-Zellen.
3. Die Reparatur-Replikation von Maus L-Zellen nach UV-Bestrahlung ließ sich durch Coffein hemmen. Dagegen war bei H.Ep.2-Zellen keine negative Beeinflussung der Reparatursynthese durch Coffein zu beobachten. Die Hemmung der Thymidin-Aufnahme UV-bestrahlter Maus L-Zellen durch Coffein entspricht der von Rauth (63) nachgewiesenen Hemmwirkung von Coffein auf Maus L-Zellen nach UV-Bestrahlung.
4. Oxyharnstoff bewirkte nach UV-Bestrahlung bei H.Ep.2-Zellen unter LH-Bedingungen bei 36$^{o}$C und in geringerem Maße auch bei 22$^{o}$C eine Steigerung der Reparatursynthese.
5. Nach UV-Bestrahlung konnte eine Abgabe von Radioaktivität durch $^{3}$H-TDR-markierte H.Ep.2-Zellen an das Inkubationsmedium nachgewiesen werden. Diese $^{3}$H-TDR-Abgabe ging mit einer Abnahme des $^{3}$H-TDR-Gehaltes der säureunlöslichen Fraktion einher und läßt auf eine Excisionsreparatur schließen.

Die untersuchten Maus L-Zellen waren nicht in der Lage, Dimere zu excisieren.

7. Es wurde festgestellt, daß bei Maus L-Zellen eine Hemmung der Reparatur-Replikation nach UV-Bestrahlung durch Coffein erfolgt, obwohl nur sehr wenig Coffein in die Zellen eingebaut wird. Der Einbau von Coffein ist bei H.Ep.2-Zellen noch geringer als bei Maus L-Zellen.

## G. LITERATURVERZEICHNIS

1. Arlett, C.F.
A failure of specific inhibitors to affect survival of Chinese hamster cells exposed to ultra-violet light
Int.J.Rad.Biol.13, 369 (1967)

2. Arlett, C.F., M.Richold
Repairreplication and unscheduled DNA synthesis in synchronous mammalian cells
Int.J.Rad.Biol. 21, 127 (1972)

3. Ayad,S.R., M.Fox
The implication of repair processes in the mechanism of DNA integration by lymphoma cells
Int. J. Rad.Biol. 15, 445 (1969)

4. Ben-Hur, E., R.Ben-Ishai
DNA repair in UV-light irradiated HeLa cells and its reversible inhibition by hydroxyurea
Photochem.Photobiol. 13, 337 (1971)

5. Beukers, R., J. Ylstra, W.Berends
The effect of ultraviolet light on some components of the nucleic acids
Rec. trav. chim. 77, 729 (1958)

6. Beukers, R., W.Berends
Isolation and identification of the irradiation product of thymine
Biochim.Biophys.Acta 41, 55o (196o)

7. Boyce, R.P., P.Howard-Flanders
Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E.coli k-12
Proc.Nat.Acad.Sci. 51, 293 (1964)

8. Brandt, W.N., W.G.Flamm, N.J.Bernheim
The value of hydoxyurea in assessing repair systems of DNA in HeLa cells
Chem. Biol. Interactions 5, 327 (1972)

9. Carrier, W.L., R.B.Setlow
Excision of pyrimidine dimers from irradiated DNA in vitro
Biochim.Biophys. Acta 129, 318 (1966)

10. Cleaver, J.E.
The relationship between the rate of DNA synthesis and its inhibition by UVL in mammalian cells
Rad.Res. 3o, 795 (1967)

11. Cleaver, J.E., R.B.Painter
Evidence for repair replication of Hela cell DNA damaged by UVL
Biochim.Biophys.Acta 161, 552 (1968)

12. Cleaver, J.E.
Repair replication and degradation of bromuracil-substituted DNA in mammalian cells after irradiation with UVL
Biophys.J. 8, 775 (1968)

13. Cleaver, J.E.
In Biological Implications of the Nuclear Age 1969
U.S. Atomic Energy Commission, Division of Technical Information, Oak Ridge, Tennessee 283

14. Cleaver, J.E.
Xeroderma pigmentosum: A human disease in which an initial stage of DNA repair is defective
Proc.Nat.Acad.Sci. 63, 428 (1969)

15. Cleaver, J.E.
Repair replication of mammalian cell DNA: Effects of compounds that inhibit DNA synthesis or dark repair
Rad.Res. 37, 334 (1969)

16. Cleaver, J.E., H.G.Thomas
Single strand interruptions in DNA and the effects of caffeine in Chinese hamster cells irradiated with UV-light
Biochem.Biophys.Res.Comm. 36, 2o3 (1969)

17. Cleaver J.E., J.E.Trosko
DNA-degradation products from mammalian cells irradiated with UV-light
Int. J. Rad. Biol. 15, 411 (1969)

18. Cleaver, J.E.
Repairreplication in Chinese hamster cells after damage from UV-light
Photochem.Photobiol. 12, 17 (197o)

19. Coyle, M.B., B.S.Strauss
Search for dark repair in cultured mammalian cells
Genetics 56, 553 (1967)

2o. Coyle,M.B., B.S.Strauss
Cell killing and accumulation of breaks in the DNA of H.Ep.2-cells incubated in the presence of hydroxyurea
Cancer Res. 3o, 2314 (197o)

21. Coyle, M.B., M.McMahon, B.Strauss
Failure of alkylated H.Ep.2-cells to replicate newly synthesized DNA
Mutation Res. 12, 427 (1971)

22. Dertinger, H., H.Jung
in "Molekulare Strahlenbiologie"
Springer-Verlag, Berlin 1969

23. Domon, M., A.M.Rauth
UV-irradiation of mouse L cells: Effects on DNA synthesis and progression through the cell cycle
Rad.Res. 35, 35o (1968)

24. Domon, M.,A.M.Rauth
Effects of caffeine on UV-irradiated mouse L-cells
Rad.Res. 39, 2o7 (1969)

25. Domon, M., A.M.Rauth
UVL-irradiation of mouse L-cells: Effects on cells in DNA synthesis phase
Rad.Res. 4o, 414 (1969)

26. Domon, M., B.Barton, A.Porte,A.M.Rauth
The interaction of caffeine with UVL-irradiated DNA
Int.J.Rad.Biol. 17, 395 (197o)

27. Dulbecco, R.
in "Radiation Biology", Vol.2,
McGraw-Hill, New York, 1955

28. Eagle, H.
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures
Science 13o, 432 (1959)

29. Epstein, J.H., K.Fukuyama, K.Fye
Effects of ultraviolet radiation on the mitotic cycle and DNA, RNA an protein synthesis in mammalian epidermis in vivo
Photochem.Photobiol. 12, 57 (197o)

3o. Fjelde, A.
Human tumor cells in tissue culture
Cancer 8, 845 (1955)

31. Fox, M., B.W.Fox
Repair replication after UV-irradiation in rodent cells
Int.J.Rad.Biol. 23, 359 (1973)

32. Fuyiwara, Y, T.Kondo
Caffeine-senstive repair of UVL-damaged DNA of mouse L-cells
Biochem.Biophys.Res.Comm. 47, 557 (1972)

33. Gautschi, J.R., B.R.Young, J.E.Cleaver
Repair of damaged DNA in the absence of protein synthesis in mammalian cells
Exp.Cell Res. 76, 87 (1973)

34. Handschumacher, R.E., A.D. Welch
Agents which influence nucleic acid metabolism
in "The Nucleic Acids" Vol.III,pp. 453 ff.
Academic Press, New York and London, 196o

35. Hartley-Asp, B., B.A. Kihlmann
Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations, IV. Synergism between mitomycin C and caffeine in Chinese hamster cells
Hereditas 69, 326 (1971)

36. Hartmann, D.
Die Spaltung von Dimerem Thymindurch ionisierende Strahlung und ihre Wirkung bei der Inaktivierung von Bakterien
Habilitationsschrift FB 2, Freie Universität Berlin 197o

37. Haynes, R.H.
General Discussion
Rad.Res. Suppl. 6, 231 (1966)

38. Horikawa, M., O. Nikaido, T.Sugahara
Dark reactivation of damage induced by UVL in mammalian cells in vitro
Nature 218, 489 (1968)

39. Howard-Flanders, P., R.P.Boyce
DNA repair and genetic recombination :
Studies on mutants of E.coli defective in these processes
Rad.Res.Suppl. 6, 156 (1966)

40. Howard-Flanders, P.
DNA - repair
Ann. Rev. Biochem. 37, 175 (1968)

41. Jagger, J., R.S.Stafford
Evidence for two mechanisms of photoreactivation in E.coli B
Biophys.J. 5,75 (1965)

42. Kaplan, J.C., S.R.Kushner, L.Grossmann
Enzymatic repair of DNA. 1. Purification of two enzymes involved in the excision of thymine dimers from UV irradiated DNA
Proc.Nat.Acad.Sci. 63, 144 (1966)

43. Kelner, A.
Effect of visible light on the recovery of Streptomyces griseus conidia from irradiation injury
Proc.Nat.Acad.Sci. 35, 73 (1949)

44. Kihlmann, B.A., S.Sturelid, B.Hartley-Asp, K.Nilsson
Caffeine potentiation of the chromosome damage produced in bean root tips and in Chinese hamster cells by various chemical and physical agents
Mutation Res. 17, 271 (1973)

45. Klimek, M., M.Vlasinova
Thymine and Uracil-Thymine-Dimers and deoxyribonucleic acid synthesis in mammalian cells irradiated with UVL
Int. J. Rad. Biol. 11, 329 (1966)

46. Kneser, H., K.Metzger, W.Sauerbier
Evidence of different mechanisms for ultraviolet reactivation and "Ordinary Host Cell Reactivation" of phage
Virology 27, 213 (1965)

47. Kuhlmann, W., H.G.Fromme, E.M.Heege, W.Ostertag
The mutagenic action of caffeine in higher organisms
Cancer Res. 28, 2375 (1968)

48. Landeck, A.
Untersuchungen über die Schädigung und das Reparaturvermögen von H.Ep.2-Zellen nach UV- und Röntgenbestrahlung
Dissertationsschrift FB 22, Freie Universität Berlin 1972

49. Lee, S.
Chromosome aberrations induced in cultured human cells by caffeine
Japan.J.Genetics 46, 337 (1971)

5o. Lehmann, A.R.
Effect of caffeine on DNA synthesis in mammalian cells
Biophys.J. 12, 1316 (1972)

51. Lehmann, A.R.
Postreplication repair of DNA in UV irradiated mammalian cells
J.Mol.Biol. 66, 319 (1972)

52. Lehmann, A.R., S. Kirk-Bell
Effects of caffeine and theophylline on DNA synthesis in unirradiated and UV-irradiated mammalian cells
Mutation Res. 26, 73 (1974)

53. Lindahl, T.
Excision of pyrimidine dimers from ultraviolet irradiated DNA by exonucleases from mammalian cells
Europ. J. Biochem. 18, 4o7 (1971)

54. Neuhard, J.
Studies on the acid-soluble nucleotide pool in E.coli, IV. Effects of Hydoxyurea
Biochim. Biophys.Acta 145, 1 (1967)

55. Ørstavik, J.
Caffeine sensitive recovery of mitomycin C treated mouse P-388 cells
Acta Pathol.Microbiol.Scand. 8ob, 9oo (1972)

56. Painter, R.B., J.E.Cleaver
Repair replication, unscheduled DNA synthesis and the repair of mammalian DNA
Rad.Res. 37, 451 (1969)

57. Pathak, M.A., D.M.Krämer, U.Güngerich
Formation of thymine dimers in mammalian skin by ultraviolet radiation in vivo
Photochem.Photobiol. 15, 177 (1972)

58. Pettijohn, D., P.C. Hanawalt
Evidence for repair replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria
J.Mol.Biol. 9, 395 (1964)

59. Pfeiffer, S.E., L.J. Tolmach
Inhibition of DNA synthesis in Hela cells by hydoxyurea
Cancer Res. 27, 124 (1967)

6o. Rasmussen, R.E., R.B.Painter
Evidence for repair of UV damaged DNA in cultured mammalian cells
Nature 2o3, 136o (1964)

61. Rasmussen, R.E., R.B. Painter
Radiation-stimulated DNA synthesis in cultured mammalian cells
J.Cell Biol. 29, 11 (1966)

62. Rauth, A.M.,G.F.Whitmore
The survival of synchronized L cells after ultraviolet irradiation
Radiation Res. 28, 84 (1966)

63. Rauth, A.M.
Evidence for dark-reactivation of ultraviolet light damage in mouse L cells
Radiation Res. 31, 121 (1967)

64. Rauth, A.M., B.Barton, C.P.Y.Lee
Effects of caffeine on L cells exposed to mitomycin C
Cancer Res. 3o, 2724 (197o)

65. Regan, J.D., J.E.Trosko, W.L.Carrier
Evidence for excision of ultraviolet-induced pyrimidine dimers from the DNA of human cells in vitro
Biophys. J. 8, 319 (1968)

66. Richold, M., C.F.Arlett
Repair replication and unscheduled DNA synthesis in synchronous mammalian cells
Int.J.Rad.Biol. 21, 127 (1972)

67. Rommelaere, J., M.Errera
The effect of caffeine on the survival of UV-irradiated diploid and tetraploid Chinese hamster cell

68. Rosenkranz, H.S., S.J.Jacobs,H.S.Carr
Studies with hydoxyurea VIII. The deoxyribonucleic acid of hydroxyurea treated cells
Biochim.Biophys.Acta 161, 428 (1968)

69. Rupert, C.S.
Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from baker´s yeast
J.Gen.Physiol. 43, 573 (196o)

7o. Rupert, C.S.
Repair of ultraviolet damage in cellular DNA
J. Cellualar Comp. Physiol.Suppl. 1, 58,57 (1961)

71. Rupert, C.S.
a. Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA, I. Kinetics of reaction
b. II. Formation of an enzyme -substrate complex
J.Gen.Physiol. 45, a.7o3 b. 725 (1962)

72. Rupert, C.S.
Questions regarding the presumed rule of thymine dimer in photoreactivable lesions in DNA
Proc. Nat.Acad. Sci. 53, 143o (1964)

73. Rupert, C.S., W. Harm
Reactivation after photobiological damage in "Advances in Radiation Biology", Vol.2
Academic Press New York 1966

74. Setlow, J.K.
Photoreactivation
Rad.Res.Suppl. 6, 141 (1966)

75. Setlow, R.B., W.L.Carrier
The disappearance of thymine dimers from DNA: An error correcting machanism
Proc.Nat.Acad Sci. 51, 226 (1964)

76. Setlow, R.B, J.D.Regan, W.L.Carrier
Abs.Ann.Meeting Biophys. Soc. Toronto1972

77. Setlow, R.B., J.K.Setlow
Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage
Proc.Nat.Acad.Sci. 48, 125o (1962)

78. Sinclair, W.K.
Hydoxyurea: Effect on Chinese hamster cells grown in culture
Cancer Res. 27, 297 (1967)

79. Smets, L.A.
Repair incorporation of pyrimidine deoxynucleosides into DNA of mammalian cells exposed to UV
Biophysik 6, 85 (1969)

8o. Smith, K.C.
Photochemical reactions of thymine, uracil, uridine, cytosine and bromuracil in frozen solutions and in dried films
Photochem.Photobiol. 2, 5o3 (1963)

81. Smith, K.C.
Photochemical addition of amino acids to $^{14}$C-uracil
Biochem.Biophys.Res.Comm. 34, 354 (1969)

82. Smith, K.C., P.C. Hanawalt
Molecular Photobiology
Academic Press New York 1969

83. Trosko,J.E., E.H.Y. Chu, W.L.Carrier
The induction of thymine dimers in Uv irradiated mammalian cells
Rad.Res. 24, 667 (1965)

84. Trosko, J.E., E.H.Y. Chu
Effect of caffeine on the induction of mutations in Chinese hamster cells by UVL
Mutation Res. 12, 337 (1971)

85. Trosko, J.E., M.R. Kasschau
Study of pyrimidine dimers in mammalian cells surviving low doses of ultraviolet radiations
Photochem.Photobiol. 6, 215 (1967)

86. Trosko, J.E., V.H.Mansour
Photoreactivation of ultraviolet light-induced pyrimidine dimers in Ginkgo cells grown in vitro
Mutation Res. 7, 12o (1969)

87. Ts´o, P.O.P., P.Lu
Interaction of nucleic acids I.
Physical binding of thymine, steroids and aromatic hydrocarbos to nucleic acids
Proc.Nat.Acad.Sci. 51, 17 (1964)

88. Varghese, A.J., C.S. Rupert
UV-irradiation of cytosine nucleosides in frozen solutions produces cyclobutane-type dimeric products
Photochem.Photobiol. 13, 365 (1971)

89. Verly, W.G., E.Ledru
Action of hydroxyurea on survival of EMS-treated or UV-irradiated HeLa cells
Eur. J. Clinical Biol.Res. 8, 788 (1971)

9o. Wacker, A., H.Dellweg, D.Weinblum
Strahlenchemische Veränderungen der Bakterien-DNS in vivo
Naturwissensch. 47, 477 (196o)

91. Wacker, A., H.Dellweg, E.Lodemann
Strahlenchemische Veränderungen der Nukleinsäuren
Angew. Chemie 73, 64 (1961)

92. Wacker, A., D.Weinblum, L.Träger, Z.H.Moustafa
Photochemische Reaktionen von Uracil und Uridin
J.Mol.Biol. 3, 79o (1961)

92.a. Wacker, A., H.Feller, P.Chandra, T.K.R.Reddy
Effect of adenosine-(3,5)-monophosphate on the inhibition of dark repair by caffeine
Zeitschr.f.Naturf. 26 b, 2 (1971)

93. Walker, J.G., B.D.Reid
Caffeine potentiation of the letal action of alkylating agents on L cells
Mutation Res. 12, 1o1 (1971)

94. Warner, H.R., M.D.Hobbs
Effects of hydoxyurea on replication of bacteriophage T4 in E.coli
J.Virol. 3, 331 (1969)

95. Weinblum, D., H.E.Johns
Isolation and properties of isomeric thymine dimers
Biochem.Biophys.Acta 114, 45o (1966)

96. Weinstein, D.,J.Mauer, H.M.Solomon
The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes
Mutation Res. 16, 391 (1972)

97. Wilkinson, R., R.J.Kiefer,H.W.Nias
Effects of post treatment with caffeine on the sensitivity to ultraviolet light irradiation of two lines of Hela cells
Mutation Res. 1o, 67 (197o)

98. Wulff, D.L., G.Fraenkel
On the nature of thymine photoproduct
Biochim.Biophys.Acta 51, 332 (1961)

99. Wulff, D.L., C.S. Rupert
Disappearance of thymine photo dimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from baker's yeast
Biochem.Biophys.Res.Commun. 7, 237 (1962)

1oo. Young, C.W., G.Schochtemann, D.A.Karnofsky
Hydroxyurea-induced inhibition of Deoxyribonucleotide Synthesis: Studies in intact cells
Cancer Res. 27, 526 (1967)

1o1. Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen
7.Auflage 1968, S.193

1o2. Reichert, U., R.Schmidt
Untersuchungen zum Stofftransport durch Zellmembranen
Pressedienst Wissenschaft, Freie Unviversität Berlin, Heft 4, 1974

1o3. Shahin, M.M., N.E.Gentner, A.Nasim
The effect of liquid holding in Schizosaccharomyces Pombe strains after gamma and ultraviolet irradiation
Rad.Res. 53, 216 (1973)

1o4. Painter, R.B.
The action of ultraviolet light on mammalian cells in "Physiology", Vol. 5, 169
Academic Press New York and London 197o

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dieter Hartmann danke ich für die Überlassung des Themas und für die ständige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. K.-O. Habermehl, Institut für klinische und experimentelle Virologie der DFG, Berlin, sage ich meinen Dank für die großzügige Überlassung der Zellkulturen.

Für die technische Hilfe möchte ich auch Frau Christa Aichele meinen Dank aussprechen.

# L E B E N S L A U F

Brigitta Lehmann

| | |
|---|---|
| 5.4.1947 | geboren in Berlin als Tochter des Diplom-Kameralisten Friedrich Lehmann und seiner Ehefrau Inge geb. Kraft |
| 1953 - 1959 | Besuch der 6. Grundschule Berlin - Tempelhof |
| 1959 - 1966 | Askanisches Gymnasium 2. OWZ Berlin - Tempelhof |
| 16.2.1966 | Reifeprüfung |
| 1966 - 1967 | Praktikantin der Geibel - Apotheke in Berlin-Lichtenrade |
| 1967 - 1968 | Praktikantin der Viktoria-Apotheke in Berlin-Tempelhof |
| 28.3.1968 | Pharmazeutisches Vorexamen |
| 1968 - 1971 | Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin |
| 11.1o.1971 | Pharmazeutisches Staatsexamen |
| seit 1.3.1972 | Doktorandin am Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie |

difo-druck · 8600 bamberg · untere königstraße 30